



Joana Sofia Cassidy

**Avaliação da qualidade da água do rio Cértima
através de ensaios ecotoxicológicos**



Joana Sofia Cassidy

**Avaliação da qualidade da água do rio Cértima
através de ensaios ecotoxicológicos**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia do Ambiente, realizada sob a orientação científica do Doutor Mário Miguel Azevedo Cerqueira, Professor Auxiliar do Departamento de Ambiente e Ordenamento da Universidade de Aveiro, e do Doutor Nelson José de Cabaços Abrantes, estagiário de Pós-Doutoramento do Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (CESAM) da Universidade de Aveiro.

o júri

Presidente

Prof. Doutora Ana Isabel Couto Neto da Silva Miranda

Professora Associada do Departamento de Ambiente e Ordenamento da
Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Fernando José Mendes Gonçalves

Professor Associado com Agregação do Departamento de Biologia da
Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Mário Miguel Azevedo Cerqueira (Orientador)

Professor Auxiliar do Departamento de Ambiente e Ordenamento da
Universidade de Aveiro

Doutor Nelson José de Cabaços Abrantes (Co-orientador)

Estagiário de Pós-Doutoramento do Centro de Estudos do Ambiente e do Mar
(CESAM) da Universidade de Aveiro

Agradecimentos

Não teria sido possível concluir este trabalho sem a ajuda de diversas pessoas.

Em primeiro lugar quero agradecer ao meu orientador Doutor Mário Cerqueira e ao meu co-orientador Doutor Nelson Abrantes por todo o apoio, disponibilidade, incentivo e conhecimento partilhado indispensáveis para a elaboração e conclusão deste trabalho.

Gostaria também de agradecer a todos no laboratório LEADER do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro por me terem acolhido e ajudado sempre que necessitei. Agradeço ao Doutor Fernando Gonçalves por ter disponibilizado o laboratório e equipamentos indispensáveis para a realização do trabalho.

Agradeço também a ajuda da Mestre Raquel Ferreira no fornecimento de material muito útil para a elaboração do trabalho.

Aos meus pais, avós e irmã um enorme obrigada por todo o apoio, motivação e por acreditarem sempre em mim e nas minhas capacidades nesta e em todas as etapas da minha vida.

A todos os meus amigos por todo o apoio, motivação e jantares tardios quando já não havia energia.

palavras-chave

Qualidade de água de rios, monitorização físico-química, avaliação ecotoxicológica, ecossistemas aquáticos, Bacia hidrográfica do rio Cértima

Resumo

O objectivo geral deste trabalho foi avaliar a qualidade da água da bacia hidrográfica do rio Cértima através de ensaios ecotoxicológicos. Para isso foram seleccionados três locais de amostragem ao longo do rio, com impacto antropogénico diferente: Parada, Ponte do Repolão e Lagoa Seca. Foram consideradas duas campanhas de amostragem a fim de avaliar a variabilidade sazonal: Novembro de 2009 e Abril de 2010. A avaliação ecotoxicológica envolveu uma bateria de ensaios com diferentes espécies: a bactéria *Vibrio fischeri*, a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*, a macrófita *Lemna minor* e o cladóceros *Daphnia magna*. Paralelamente foi efectuada uma análise físico-química, a qual permitiu identificar problemas de poluição de origem antrópica nos locais Ponte do Repolão e Lagoa Seca. Por outro lado, o local Parada, seleccionado como local de referência apresentou valores típicos de um local com reduzida ou nula pressão antropogénica. Os ensaios ecotoxicológicos revelaram efeitos na taxa de crescimento das espécies *L. minor* e *P. subcapitata* no local Parada, no entanto estes efeitos deveram-se claramente à limitação em nutrientes da amostra. No local Ponte do Repolão, foi observada toxicidade elevada para *V. fischeri* ($EC_{50} = 44,85$) na campanha de Novembro de 2009 e um decréscimo na taxa de crescimento de *L. minor* (LOEC = 75%) na campanha de Abril de 2010. O local Lagoa Seca apresentou efeitos negativos na taxa de crescimento de *P. Subcapitata* (LOEC=75%) na campanha de Novembro 2009. O organismo *D. magna* apresentou estímulos nos locais Lagoa Seca e Ponte do Repolão, em ambas as campanhas, possivelmente devido à presença de partículas nutritivas dissolvidas e algas, abundantes em locais eutrofizados. Dada a natureza essencialmente orgânica da poluição da bacia do rio Cértima, os ensaios ecotoxicológicos efectuados mostraram algumas limitações, já que a elevada carga de nutrientes dos locais Lagoa Seca e Ponte do Repolão podem ter mascarado a possível toxicidade de contaminantes, favorecendo inclusive o crescimento dos organismos. Por outro lado, a limitação em nutrientes no local tido como referência – Parada, condicionou o crescimento nos ensaios com plantas. Deste modo, a análise ecotoxicológica, em locais sujeitos a poluição orgânica deve ser sempre complementada com uma avaliação físico-química e ecológica das comunidades locais, de modo a obtermos uma visão holística do estado de qualidade da água.

Keywords

River water quality, physico-chemical monitoring, ecotoxicology, aquatic ecosystems, Cértima River.

Abstract

The main objective of this work was to assess the water quality of the Cértima River (Central Portugal) with ecotoxicological assays. For this purpose three sampling sites were selected on the river basin that were known to be under different human pressures: Parada, Ponte do Repolão and Lagoa Seca. To evaluate the influence of seasonal variation there were two sampling periods: November 2009 and April 2010. Several species were used in the ecotoxicological analysis, such as the bacteria *Vibrio fischeri*, the algae *Pseudokirchneriella subcapitata*, the macrophyta *Lemna minor* and the cladoceran *Daphnia magna*. Physico-chemical parameters were also analysed showing that the Cértima watershed pointed some pollution problems including eutrophication on sites Ponte do Repolão and Lagoa Seca. The site Parada, selected as a reference site, showed concentrations of the physical and chemical parameters typical of a site with almost none human pressures.

The ecotoxicological analysis showed negative effects on the growth rate of *L. minor* and *P. subcapitata* on the site Parada, but this was clearly due to nutrients limitation. The site Ponte do Repolão showed high toxicity for *V. fischeri* ($EC_{50} = 44,85$) in November 2009 and a decrease on the growth rate of *L. minor* (LOEC = 75%) in April 2010. Lagoa Seca showed a decrease of the growth rate of *P. subcapitata* (LOEC = 75%) in November 2009. *D. magna* had an increase of growth rate on Ponte do Repolão and Lagoa Seca possibly due to the presence of dissolved nutritive particles and algae, abundant in eutrophized sites. Being the pollution essentially organic, the ecotoxicological assays showed some limitations. The high load of nutrients on the sites Lagoa Seca and Ponte do Repolão may have masked the toxicity of contaminants and inclusive favoured the growth of organisms. On the other hand the nutrient limitations on the site considered to be a reference – Parada, conditioned the growth in the plant assays. Thus, the ecotoxicological analysis on sites with organic pollution should always be complemented with a physico-chemical and ecological analysis of the local communities so that it is possible to obtain an holistic overview of the water quality status.

Índice

| | |
|---|-----|
| Índice | i |
| Índice de tabelas..... | v |
| Índice de Figuras | vii |
| Capítulo 1 – Introdução | 3 |
| 1.1. Importância dos recursos hídricos e da sua monitorização..... | 3 |
| 1.2. Avaliação ecotoxicológica da água..... | 5 |
| 1.2.1. Ensaio de toxicidade | 5 |
| 1.2.2. Organismos mais utilizados em ensaios de toxicidade de água doce | 7 |
| 1.3. Legislação em vigor | 10 |
| 1.4. Bacia Hidrográfica do rio Cértima | 12 |
| 1.5. Âmbito e objectivos | 16 |
| Capítulo 2 – Descrição da bacia hidrográfica do rio Cértima | 19 |
| 2.1. Enquadramento geográfico..... | 19 |
| 2.2. Enquadramento fisiográfico | 20 |
| 2.3. Vegetação, ocupação do solo e seus efeitos nos recursos hídricos..... | 20 |
| 2.4. Caracterização socioeconómica | 21 |
| 2.4.1. Actividades económicas..... | 21 |
| 2.4.2. Infra-estruturas de saneamento básico | 23 |
| Capítulo 3 – Material e Métodos | 27 |
| 3.1. Locais e datas de amostragem | 27 |
| 3.2. Parâmetros Físico-químicos | 29 |
| 3.1.1. Amostragem e medições no campo | 29 |
| 3.1.2. Métodos Analíticos | 29 |

| | |
|--|----|
| 3.3. Ensaaios ecotoxicológicos | 30 |
| 3.3.1. Amostragem | 30 |
| 3.3.2. <i>Vibrio fischeri</i> | 30 |
| 3.3.2.1. Teste Microtox® de toxicidade agudo..... | 30 |
| 3.3.3. <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> | 31 |
| 3.3.3.1. Cultura e Manutenção de organismos | 31 |
| 3.3.3.2. Teste de inibição de crescimento..... | 33 |
| 3.3.4. Ensaio com <i>Lemna minor</i> | 35 |
| 3.3.4.1. Cultura e manutenção de organismos | 35 |
| 3.3.4.2. Teste de inibição do crescimento..... | 37 |
| 3.3.5. <i>Daphnia magna</i> | 38 |
| 3.3.5.1. Cultura e manutenção de organismos | 38 |
| 3.3.5.2. Teste de reprodução..... | 40 |
| 3.3.6. Análise Estatística | 42 |
| Capítulo 4 – Resultados e Discussão | 47 |
| 4.1. Qualidade físico-química da água | 47 |
| 4.1.1. Parâmetros organolépticos | 47 |
| 4.1.2. Parâmetros físico-químicos..... | 47 |
| 4.1.3. Classificação do estado trófico..... | 56 |
| 4.2. Avaliação ecotoxicológica | 57 |
| 4.2.1. Ecotoxicidade para <i>Vibrio fischeri</i> | 57 |
| 4.2.2. Ecotoxicidade para <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> | 59 |
| 4.2.3. Ecotoxicidade para <i>Lemna minor</i> | 61 |
| 4.2.4. Ecotoxicidade para <i>Daphnia magna</i> | 64 |
| Capítulo 5 – Considerações finais | 69 |
| Capítulo 6 – Referências Bibliográficas | 75 |

| | |
|--|----|
| ANEXOS | 85 |
| ANEXO A: Valores máximos admissíveis (VMA) e valores máximos recomendados (VMR) para os parâmetros de qualidade da água constantes no Decreto-Lei nº 236/98, de 1 de Agosto..... | 85 |
| ANEXO B: Critérios para a avaliação do estado trófico de rios, segundo Dodds et al. (1998): | 86 |

Índice de tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Distribuição da população activa, segundo o sector de actividade, nos concelhos principais da bacia do rio Cértima, 2001. Dados do Instituto Nacional de Estatística, 2006 (CCDR -C, 2008). | 22 |
| Tabela 2 - População servida por infra-estruturas de saneamento básico referentes ao ano de 2001 (INE, 2005). | 24 |
| Tabela 3 - Composição química do meio de cultura MBL | 32 |
| Tabela 4 - Diluições efectuadas para o teste de inibição do crescimento de <i>P. Subcapitata</i> | 34 |
| Tabela 5 - Composição química dos macroelementos e microelementos do meio de cultura Steinberg..... | 36 |
| Tabela 6 - Diluições efectuadas para o teste de inibição do crescimento de <i>Lemna minor</i> | 37 |
| Tabela 7- Composição química do meio de cultura sintético ASTM <i>hard water</i> e suas características físicas (adaptado de ASTM, 1980) | 39 |
| Tabela 8 - Volume de extracto adicionado ao meio de cultura consoante o volume de ASTM..... | 40 |
| Tabela 9 - Diluições efectuadas para o teste de reprodução de <i>D. magna</i> | 40 |
| Tabela 10 - Descrição dos parâmetros organolépticos verificados nas duas campanhas de monitorização em cada local de amostragem..... | 47 |
| Tabela 11 - Estado trófico a 3 de Novembro de 2009 e a 7 de Abril de 2010..... | 56 |
| Tabela 12 - Síntese dos valores de EC ₅₀ em percentagem de amostra para 95% de confiança para a inibição de luminescência de <i>V. fischeri</i> | 58 |
| Tabela 13 - Resumo da análise de variância simples (ANOVA unifactorial) feita às diferenças na taxa de crescimento (dia ⁻¹) de <i>P. subcapitata</i> entre diferentes concentrações de cada amostra e controlo, dos valores de NOEC e LOEC e síntese dos | |

valores de EC_{50} em percentagem de amostra para 95% de confiança para a taxa de crescimento de *P. subcapitata* na amostra sem adição de nutrientes (100%) e com adição de nutrientes (100%+N)..... 60

Tabela 14 – Resumo do teste t de student de comparação das taxas de crescimento..... 61

Tabela 15 - Resumo da análise de variância simples (ANOVA unifactorial) feita às diferenças na taxa de crescimento (dia^{-1}) de *L. minor* entre diferentes concentrações de cada amostra e controlo, valores de NOEC e LOEC e síntese dos valores de EC_{50} em percentagem de amostra para 95% de confiança para a taxa de crescimento de *L. minor* na amostra sem adição de nutrientes (100%) e com adição de nutrientes (100%+N) 63

Tabela 16 - Resumo do teste t de student para comparação das taxas de crescimento .. 63

Tabela 17 - Resumo da análise de variância simples (ANOVA unifactorial) feita às diferenças na taxa de crescimento diário, TCD, de *D. magna* entre diferentes concentrações de amostra e controlo, valores de NOEC e LOEC e síntese dos valores de EC_{50} em percentagem de amostra para 95% de confiança. 65

Tabela 18 - Resumo da análise de variância simples (ANOVA unifactorial) feita às diferenças na taxa de crescimento intrínseco, r (dia^{-1}), de *D. magna* entre diferentes concentrações de amostra e controlo, valores de NOEC e LOEC e síntese dos valores de EC_{50} em percentagem de amostra para 95% de confiança. 66

Índice de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1 - <i>Vibrio fischeri</i> | 8 |
| Figura 2 - <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> | 8 |
| Figura 3 - <i>Lemna minor</i> | 9 |
| Figura 4 - <i>Daphnia magna</i> | 9 |
| Figura 5 - Localização da sub-bacia do rio Cértima no território português (retirado de Silva, 2008)..... | 19 |
| Figura 6 - Parada..... | 27 |
| Figura 7 - Lagoa Seca | 27 |
| Figura 8 - Ponte do Repolão | 28 |
| Figura 9 - Mapa com a identificação dos locais de amostragem na bacia hidrográfica do rio Cértima (Ref.1 – Parada; 1 – Lagoa Seca; 2 – Ponte do Repolão). | 28 |
| Figura 10 - Esquema representativo do sistema de cultura da alga <i>P. subcapitata</i> . 1 – Cultura de <i>P. subcapitata</i> em meio de cultura MBL; 2- Tubo de arejamento; 3- Tubo de saída de ar protegido com uma rolha de gaze; 4 – Filtro de 0,2 µm; 5 – Tubo de transferência..... | 33 |
| Figura 11 - Esquema da anatomia de <i>D. magna</i> (adaptado de Cooney, 1995)..... | 41 |
| Figura 12 - Variação da temperatura da água (°C), condutividade (µS/cm) e pH em cada local de amostragem nas duas campanhas de amostragem..... | 50 |
| Figura 13 - Variação da concentração de oxigénio dissolvido (mg/L), percentagem de saturação em oxigénio dissolvido (%) e carência bioquímica de oxigénio (mg O ₂ /L) em cada local de amostragem nas duas campanhas de amostragem. | 52 |
| Figura 14 - Variação dos Sólidos Suspensos Totais e Voláteis (mg/L) em cada local de amostragem nas duas campanhas de amostragem..... | 53 |
| Figura 15 - Fósforo Total (mg P/L), azoto amoniacal (mg N/L) e NO ₃ ⁻ (mg N/L) em cada local de amostragem nas duas campanhas de amostragem..... | 55 |

| | |
|--|----|
| Figura 16 - Inibição de luminescência para <i>V. fischeri</i> em cada local de amostragem nas duas campanhas. | 58 |
| Figura 17 - Taxa de crescimento (dia^{-1}) determinada para <i>P. subcapitata</i> quando exposta às diferentes amostras de água recolhidas em Novembro de 2009 e em Abril de 2010. As barras de erro indicam o erro padrão, os asteriscos indicam diferenças significativas entre concentrações e o controlo ($p < 0.05$) e as letras indicam diferenças significativas entre a concentração 100% e a concentração 100%+N. (100%+N corresponde à concentração 100% com adição de nutrientes segundo a formulação do meio MBL). | 60 |
| Figura 18 - Taxa de crescimento (dia^{-1}) determinada para <i>L. minor</i> quando exposta às diferentes amostras de água recolhidas em Novembro de 2009 e em Abril de 2010. As barras de erro indicam o erro padrão, os asteriscos indicam diferenças significativas entre concentrações e o controlo ($p < 0.05$) e as letras indicam diferenças significativas entre a concentração 100% e a concentração 100%+N. (100%+N corresponde à concentração 100% com adição de nutrientes segundo a formulação do meio Steinberg) | 62 |
| Figura 19 - Taxa de crescimento diário, TCD, (dia^{-1}) determinada para <i>D. magna</i> quando exposta às diferentes amostras de água recolhidas em Novembro de 2009 e em Abril de 2010. As barras de erro indicam o erro padrão e os asteriscos indicam diferenças significativas entre concentrações e o controlo ($p < 0.05$). | 64 |
| Figura 20 - Taxa de crescimento intrínseco, r (dia^{-1}), determinada para <i>D. magna</i> quando exposta às diferentes amostras de água recolhidas em Novembro de 2009 e em Abril de 2010. As barras de erro indicam o erro padrão e os asteriscos indicam diferenças significativas entre as concentrações de cada amostra e o controlo ($p < 0.05$). | 66 |

Capítulo 1

Introdução

Capítulo 1 – Introdução

1.1. Importância dos recursos hídricos e da sua monitorização

Ao longo de séculos a população humana tem vindo a exercer uma pressão cada vez maior nos recursos aquáticos, ao usá-los para satisfazer as suas necessidades, para fins industriais, urbanos, agrícolas e energéticos. Considerando que o nosso planeta está coberto por 2/3 de água, poderíamos considerar que a água é um recurso abundante, contudo apenas 0,63% da água existente no mundo está disponível para consumo humano (Gleick, 1993). Além disso, a qualidade da água doce tem vindo a sofrer uma degradação a nível mundial, essencialmente devido a actividades antropogénicas. Entre elas, são mais evidentes as descargas de efluentes agrícolas, industriais e urbanas e também a poluição difusa proveniente de escorrências de químicos usados na agricultura (Sondergaard e Jeppesen, 2007; Kangur e Mols, 2008; Orioli *et al.*, 2008; Withers e Jarvie 2008). Também o aumento da procura deste bem cria uma necessidade urgente de assegurar água potável suficiente para o bem-estar humano, no entanto é indispensável prevenir efeitos negativos na diversidade biológica, nos ecossistemas aquáticos e na perda de serviços dos ecossistemas (Allan e Castillo, 2007). Assim, garantir a qualidade da água tornou-se uma das maiores preocupações da actualidade.

Em Portugal os recursos de água doce são abundantes, com uma precipitação anual de cerca de 78.67 km³/ano (FAO, 2010), sendo 92% águas superficiais e 8% águas subterrâneas. No entanto, embora este recurso seja abundante no território nacional, o mesmo não se encontra distribuído equitativamente. Isto deve-se ao facto de haver maior precipitação no Norte de Portugal dependente da variabilidade sazonal, uma vez que é mais concentrada no período de Inverno. De entre os três grandes principais sectores que utilizam o recurso água, o sector da agricultura apresenta-se como o maior consumidor com cerca de 87%, enquanto a indústria e o sector urbano consomem 8% e 5%, respectivamente (PNA, 2001).

A água doce é um recurso fundamental para a manutenção e sobrevivência dos ecossistemas (Allan e Castillo, 2007). A diversidade biológica nos ecossistemas aquáticos está a diminuir muito mais do que a diversidade biológica terrestre e se as pressões humanas continuarem a aumentar as previsões para estes ecossistemas serão alarmantes ou mesmo catastróficas. Existem cinco categorias de ameaças que afectam significativamente a biodiversidade e que necessitam, urgentemente, de ser tratadas: i) a

degradação dos habitats como resultado de construção de barragens, dragagens, actividades nocivas ao longo das margens que destabilizam as mesmas e mudanças no uso dos solos que afectam a hidrologia com consequências nos processos físicos e na biota; ii) poluição difusa ou pontual muito espalhada tornando a água, em muitas zonas do mundo, insegura tanto para a população humana como para a vida aquática; iii) a introdução de espécies exóticas que afectam negativamente as espécies locais via predatório, competição, alteração do habitat; iv) a sobreexploração que leva ao decaimento do número de indivíduos; v) as alterações climáticas têm impactos directos na alteração da temperatura e padrões de escoamento e impactos indirectos em muitos aspectos da função lítica destes ecossistemas. Estas ameaças, individualmente e através da interacção umas com as outras exigem que sejam tomadas medidas urgentes para inverter o declínio da biodiversidade (Allan e Castillo, 2007).

Nesse seguimento, torna-se claro que é essencial um planeamento e gestão sustentável dos recursos hídricos a longo prazo sendo por isso crucial a monitorização tanto da quantidade como da qualidade da água de forma a que as necessidades da população humana e do ambiente sejam asseguradas. A monitorização é uma ferramenta chave para o bom planeamento pois fornece dados sobre o estado actual do recurso água possibilitando assim uma intervenção eficaz quando se justificar. Na avaliação da qualidade da água a componente química foi utilizada quase em exclusivo até ao surgimento da Directiva - Quadro Água (Directiva 2000/60/CE) que, para além dessa análise química, veio requerer análises biológicas de modo a garantir o bom estado ecológico das águas. A análise química por si só é normalmente um mau indicador de efeitos negativos em organismos pois não considera a interacção entre químicos, a heterogeneidade do ambiente, a biodisponibilidade química e o comportamento de organismos. Neste sentido, a melhor forma para avaliar os efeitos de químicos tóxicos no ambiente deverá integrar duas principais componentes: i) análise química, que nos dá informações sobre o tipo de químicos, a sua quantidade e a sua distribuição no ambiente; ii) ensaios de toxicidade, que nos permitem determinarem a relação dose-resposta entre químicos e organismos; e estudos de ecologia, de modo a conhecer como as populações, comunidades e ecossistemas respondem aos contaminantes (Connell, Lam *et al.* 1999).

1.2. Avaliação ecotoxicológica da água

1.2.1. Ensaios de toxicidade

O termo ecotoxicologia foi usado pela primeira vez em 1969 pelo Professor René Truhaut, pesquisador francês, que o definiu como sendo uma ciência que descreve os efeitos tóxicos de diversos agentes em organismos vivos, especialmente em populações e comunidades em ecossistemas. A ecotoxicologia assenta em 2 áreas principais: o estudo do ambiente com origem na ciência da ecologia e o estudo das interações de químicos tóxicos com organismos vivos individuais (a ciência da toxicologia) (*Connell et al.*, 1999).

A Toxicologia Aquática tem sido definida como o estudo dos efeitos adversos de agentes químicos e de produtos xenobióticos sobre as espécies aquáticas. Tais estudos podem ser conduzidos através de bioensaios (testes experimentais de metodologias distintas) estabelecidos de acordo com os diversos objectivos que se procuram alcançar nas avaliações (Klaassen, 2003).

A análise química de água, solo e ar permite obter informação sobre a distribuição dos químicos no ambiente, no entanto nem todos os poluentes estão biodisponíveis e alguns são acumulados em maior quantidade pelos organismos do que outros. Por exemplo, alguns poluentes agregam-se ao solo e sedimentos tornando-se indisponíveis para os organismos. Por outro lado, os organismos também removem contaminantes do seu ambiente e podem sequestrá-los em si, este fenómeno chama-se bioacumulação. Embora possamos determinar a quantidade de químicos nos organismos isto diz-nos pouco sobre a maneira como cada um responde a determinado químico. Essa resposta tem a ver com a natureza do químico e com a dose recebida pelo organismo (Connell, Lam *et al.* 1999). Assim, os ensaios ecotoxicológicos são usados como instrumentos de biomonitorização pois fornecem uma visão integrada da toxicidade em locais contaminados, com o objectivo de obter uma análise real do comportamento das substâncias no ambiente (Gerhardt, 2000).

Nos E.U.A e na Europa os ensaios de toxicidade para a avaliação da qualidade de águas e de efluentes são utilizados desde o início da década de 70, tendo sido regulamentados a partir dos anos 80 (Gomes, 2007). Estes ensaios são também usados para avaliar a toxicidade de compostos químicos e fármacos devendo estes obedecer a critérios de ecotoxicidade, entre outros, descritos na legislação nacional: i) Portaria 732-A/96 que aprova o regulamento para a notificação de substâncias químicas e para a

classificação, embalagem e rotulagem de substâncias perigosas; ii) Decreto-Lei nº 154-A/2002 que vem alterar o regulamento para a notificação de substâncias químicas e para a classificação, embalagem e rotulagem de substâncias perigosas aprovado pela Portaria 732-A/96. Para além destes documentos surgiu, em 2006, o regulamento (CE) n.º 1907/2006 relativo ao Registo, Avaliação, Autorização e Restrição de substâncias químicas (REACH - *Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals*), que entrou em vigor em 1 de Junho de 2007. Este regulamento surgiu com o objectivo de melhorar o quadro legislativo comunitário em matéria de substâncias químicas, substituindo cerca de 40 normativos. O mesmo prevê que sejam feitos ensaios ecotoxicológicos às substâncias químicas nele previsto na fase de avaliação.

O princípio fundamental pelo qual os testes de toxicidade se regem é que a resposta de organismos ecologicamente relevantes à presença ou exposição a agentes tóxicos está dependente da dose de exposição a esses mesmos agentes. Assim, os testes de toxicidade aquática foram desenvolvidos para determinar uma relação dose-resposta, ou seja, a relação entre a quantidade de contaminante ao qual o organismo está exposto e a natureza e grau de efeitos nocivos (tóxicos). Esta relação é a base para determinar o risco efectivo que esses contaminantes representam para o ambiente (Walker *et al.*, 2001). Estes bioensaios podem ser agudos ou crónicos. Os bioensaios de toxicidade aguda são os mais usados na avaliação da toxicidade dos compostos químicos e efluentes (Guillermine, 1996). Nestes, os organismos-teste são expostos a concentrações elevadas da solução teste, por um curto espaço de tempo (2 a 4 dias) relativamente ao ciclo de vida da espécie, determinando-se de seguida a taxa de mortalidade. Neste caso, simula-se, por exemplo, uma catástrofe que poderá ocorrer num dado local e que envolve a acumulação de grandes quantidades de uma substância tóxica (Cooney, 1995; Cruz, 2007; Guilhermino, 1996; Hoffman *et al.*, 1995; Walker *et al.*, 2001).

Por outro lado, nos bioensaios de toxicidade crónica os organismos-testes são expostos a concentrações baixas da substância-teste durante um período de tempo (3 a 5 semanas) considerado longo relativamente ao ciclo de vida da espécie, determinando-se, posteriormente, o crescimento, a reprodução, o comportamento ou efeitos bioquímicos. Estes bioensaios são usados para fornecer uma estimativa da concentração que não provoca efeitos nefastos nos organismos. Pretendem ainda simular as reacções dos organismos a longo prazo, quando sujeitas a concentrações pequenas e contínuas de tóxico, que podem, por exemplo, resultar do lançamento continuado de pequenas

porções de pesticida para um lago (Cooney, 1995; Cruz, 2007; Guilhermino, 1996; Hoffman *et al.*, 1995; Walker *et al.*, 2001).

Os ensaios de avaliação ecotoxicológica podem ser utilizados quer em rastreios de toxicidade química de efluentes ou de novos compostos, quer na monitorização de efluentes para determinar o seu risco para os organismos aquáticos, quer no caso de efluentes poluídos, para determinar qual o composto que está a provocar efeitos directos para que se possam tomar medidas de remediação (Cruz, 2007).

1.2.2. Organismos mais utilizados em ensaios de toxicidade de água doce

Têm sido feitos inúmeros estudos com o objectivo de encontrar organismos sensíveis a mudanças ambientais de forma a poderem ser cultivados e testados em laboratório. Isto porque estes organismos quando testados em condições controladas permitem avaliar os efeitos observáveis em ecossistemas naturais e prever possíveis efeitos futuros de pressões antropogénicas. A ciência da ecotoxicologia aquática desenvolveu-se a partir destes estudos e tem evoluído para o estudo dos efeitos tóxicos de diversos agentes ambientais (químicos, temperatura, oxigénio dissolvido, pH, etc.) na vida aquática (Hoffman, 1995).

Para seleccionar os organismos-teste a utilizar devem ser tidas em conta uma série de características (Rand *et al.*, 1995; Mason, 2002): os organismos devem apresentar um intervalo de sensibilidade amplo a vários compostos ou factores ambientais; devem apresentar distribuição natural ampla e ser abundantes durante todo o ano; devem ser representativos do tipo de ecossistema em estudo, e apresentar quer relevância ecológica, económica ou social, tanto à escala local como nacional; devem ser de fácil cultura laboratorial e passíveis de ser facilmente mantidos em boas condições, saudáveis e não parasitados.

Em águas doces, a toxicidade ambiental é frequentemente avaliada através de ensaios realizados com espécies consideradas representativas de diferentes níveis tróficos do ecossistema em estudo (Walker *et al.*, 2001; Newman e Unger, 2002). Relativamente aos produtores, os organismos de utilização mais comum são algas verdes unicelulares, por exemplo das espécies *Chlorella vulgaris* e *Pseudokirchneriella subcapitata*. São também utilizadas plantas aquáticas (e.g. *Lemna minor*). Para

representar o nível heterotrófico é utilizada a bactéria luminescente *Vibrio fischeri*. Como consumidores primários utilizam-se invertebrados como, por exemplo, microcrustáceos das espécies *Daphnia magna* e *Daphnia pulex*. Alguns dos consumidores secundários mais utilizados são os peixes das espécies *Brachydanio rerio* (vulgarmente conhecido por peixe zebra), *Poecilia reticulata* (ou guppy) e *Cyprinus carpio* (carpa) (Cooney, 1995).

A bactéria *V. fischeri* é uma bactéria gram-negativa encontrada em ambientes marinhos e tem propriedades luminescentes. É predominantemente encontrada em simbiose com outros animais marinhos mas também pode ser encontrada livre e move-se através de flagelos (Madigan *et al.*, 2008; Holt, 1994). Esta bactéria é testada utilizando o microbioteste de Microtox[®] que mede a toxicidade de uma determinada amostra através da redução da luminosidade emitida pela mesma (figura 1). Este ensaio baseia-se em

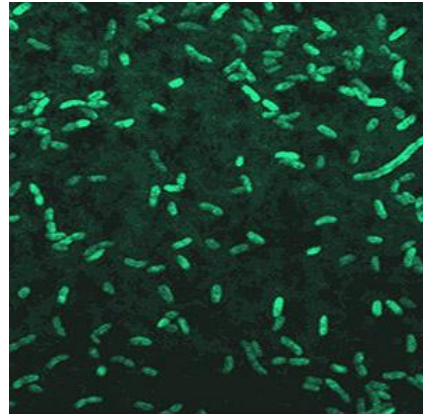


Figura 1 - *Vibrio fischeri*

variações na emissão de luz, por unidade de tempo, deste organismo. Nestas bactérias, a emissão de luz resulta de uma série de reacções bioquímicas complexas produtoras de energia. A inibição de qualquer uma dessas enzimas irá causar uma diminuição na quantidade de luz emitida. O facto da bactéria utilizada ser descongelada imediatamente antes do ensaio permite que o ensaio seja realizado em qualquer altura e qualquer local, sem que haja a necessidade de uma cultura contínua de bactérias para o ensaio (Cerejeira, 2005; Pereira *et al.* 2005). Outras vantagens deste bioensaio são a sua curta duração (alguns minutos) e a sua simplicidade de execução.

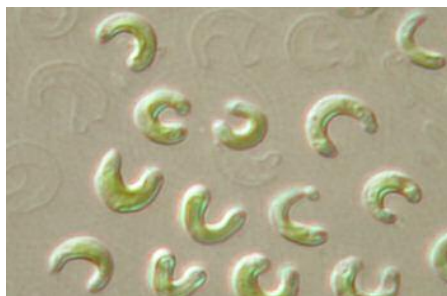


Figura 2 - *Pseudokirchneriella subcapitata*

As algas são incluídas em muitas avaliações de risco como representantes da comunidade de plantas aquáticas. As algas são ubíquas nos ecossistemas aquáticos, onde transformam energia solar em biomassa, produzem oxigénio, têm função activa no ciclo de nutrientes e servem de alimento para animais (Blaise e Férard, 2005). Devido à sua importância ecológica e sensibilidade a muitas

substâncias, especialmente a herbicidas e metais, as algas são frequentemente utilizadas em testes ecotoxicológicos (Blaise e Férard, 2005). Uma espécie de alga muito utilizada é a espécie *P. subcapitata* (figura 2), uma microalga unicelular com um único cloroplasto longo e de cor verde brilhante. Reproduz-se através de auto-esporos, produzindo pequenas réplicas da célula mãe, divide-se uniformemente e não adere às superfícies (característica vantajosa para os testes) (Cerejeira *et al.*, 2005). Outras características que tornam esta espécie como organismo-teste ideal são o seu ciclo de vida curto, altas taxas de crescimento, facilidade de manutenção de culturas e a sua capacidade de crescer em meios sintéticos bem definidos (Vidotti e Rollemberg, 2004).

A macrófita *L. minor* (figura 3), mais conhecida como lentilha de água, pertence à família das *Lemnaceae*, e é representativa das regiões temperadas. Tem reprodução vegetativa dando uma fronde origem a duas. Esta espécie é utilizada nos estudos da qualidade de água para monitorizar metais pesados e outros poluentes aquáticos pois pode acumular, selectivamente, certos químicos. Esta planta tem propriedades fisiológicas (tamanho pequeno, estrutura simples, crescimento rápido com pH compreendido entre 5 e 9 e propagação vegetativa) que a torna ideal em termos de organismo teste (Radić *et al.*, 2009).



Figura 3 - *Lemna minor*

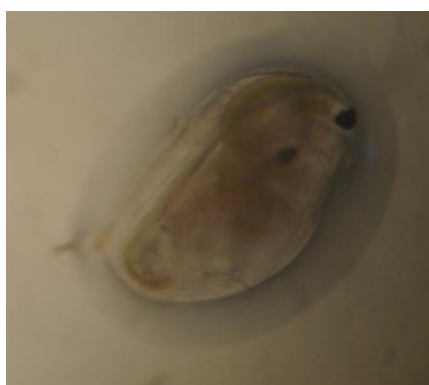


Figura 4 - *Daphnia magna*

Os cladóceros, em particular os pertencentes ao Género *Daphnia*, são historicamente considerados organismos-modelo em Ecologia, particularmente no contexto de águas doces e em ecotoxicologia (Lampert, 2006; Baudo, 1987; Baird *et al.*, 1989a; Sarma e Nandini, 2006). Os dafnídeos são organismos fáceis de cultivar em laboratório porque não exigem grande esforço material e/ou humano para serem mantidos em quantidade e com qualidade suficientes para serem validamente utilizados em contexto experimental. São organismos pequenos, o que reduz os custos da sua manutenção em laboratório para serem “manuseados” individualmente sem grande esforço (Baudo, 1987; Koivisto, 1995; Pereira,

2008). Por outro lado, *Daphnia* é um organismo partenogenético cíclico, ou seja, no seu ciclo de vida a reprodução assexuada predominante pode alternar com a sexuada (em condições de stress). Assim, sob condições controladas, é possível manter indefinidamente estes organismos sem que ocorra reprodução sexuada, o que permite excluir a variabilidade genética (Koivisto, 1995; Deng e Lynch, 1996). *Daphnia Magna* (figura 4) é uma espécie fundamentalmente eurialina, com distribuição geográfica holoártica e africana preferindo massas de água de pequena dimensão, reduzida turbidez em zonas temperadas, por vezes eutróficas e tolera gamas de pH entre 6,5 e 9,9 (Alonso, 1996; Benzie, 2005). Não há registo da presença de populações naturais desta espécie em Portugal no entanto, é talvez a mais utilizada como organismo-modelo e mais recomendada para procedimentos padronizados no âmbito da ecotoxicologia (OECD, 1998; OECD, 2004).

1.3. Legislação em vigor

Existem documentos que contribuem para a gestão e monitorização dos recursos hídricos de superfície portugueses, entre os quais, o Decreto-Lei 236/98 de 1 de Agosto, a Directiva - Quadro da Água (Directiva 2000/60/CE de 23 de Outubro) e o Plano Nacional da Água.

A Directiva - Quadro da Água (Directiva 2000/60/CE) foi aprovada em 2000, com o intuito de garantir a protecção e o uso sustentável dos recursos hídricos. Assim sendo, o seu objectivo é, como consta do artigo 1º, estabelecer um enquadramento para a protecção das águas de superfície interiores, das águas de transição, das águas costeiras e das águas subterrâneas de modo a evitar a continuação da degradação, proteger e melhorar o estado dos ecossistemas aquáticos, promover um consumo de água sustentável baseado numa protecção a longo prazo dos recursos hídricos disponíveis, reduzir as descargas, assegurar a redução gradual da poluição e contribuir para mitigar os efeitos de inundações e secas.

Este diploma introduz pela primeira vez conceitos como estado ecológico e gestão da água ao nível da bacia fluvial. Isto porque se tornou necessário desenvolver um quadro de avaliação da qualidade da água mais abrangente de forma a tentar resolver o problema dos níveis elevados de poluição verificados nas massas de água.

Esta directiva define que para se determinarem as normas de qualidade ambiental para a protecção das comunidades bióticas aquáticas os Estados-Membros deverão obter dados agudos e crónicos para os grupos taxonómicos que sejam pertinentes para o tipo de massa de água em causa, bem como para quaisquer outros taxa aquáticos para os quais haja dados disponíveis. Sendo o “conjunto de base”: i) algas e/ou macrófitos; ii) *Daphnia* ou organismos representativos para as águas salinas; iii) peixes.

O Decreto-Lei 236/98, de 1 de Agosto, surge duma necessidade de proteger o meio aquático e melhorar a qualidade da água em função dos seus principais usos (objectivo, artigo 1º). Este diploma legal tem reunidos os principais usos da água com as respectivas normas de qualidade. Para a prossecução do seu objectivo, este diploma define os requisitos a observar na utilização das águas para consumo humano (águas doces superficiais e subterrâneas destinadas à produção de água para consumo humano e águas de abastecimento para consumo humano), águas para suporte da vida aquícola (águas doces superficiais e águas do litoral e salobras para fins aquícolas - águas piscícolas, águas do litoral e salobras para fins aquícolas - águas conquículas), águas balneares e águas de rega. Nesse sentido são definidos, no diploma, os valores limites de emissão, VLE, os valores máximos admissíveis, VMA, e os valores máximos recomendados, VMR.

O Plano Nacional da Água (PNA) foi delineado na sequência da transposição da Directiva - Quadro da Água para a legislação nacional e evidencia a necessidade de valorizar, proteger e gerir de forma equilibrada os recursos hídricos. O Decreto-Lei nº45/94, de 22 de Fevereiro, (que regula o planeamento de recursos hídricos) determinou a elaboração de 15 planos de bacia hidrográfica (PBH) e do Plano Nacional da Água (PNA).

Os PBH e o PNA constituem elementos enquadradores, estratégicos e programáticos do desenvolvimento do processo de planeamento de recursos hídricos para o início do século XXI. Têm ainda como grandes objectivos contribuir, como factor potenciador, para a reestruturação do sistema normativo e institucional de recursos hídricos e, como factor instrumental, para a consecução de uma política coerente, eficaz e consequente de recursos hídricos (Plano Nacional da Água).

1.4. Bacia Hidrográfica do rio Cértima

Desde 1979 que a bacia hidrográfica do rio Cértima tem sido alvo de estudos de caracterização da qualidade da água. Em 1979, Serrano (1979) estudou a quantidade de sedimentos em suspensão transportada pelo rio até à Pateira de Fermentelos verificando que a carga em suspensão transportada pelo rio Cértima (1200 ton/ano) seria demasiado baixa para justificar a degradação considerável da qualidade da água da Pateira de Fermentelos na altura do estudo. A interferência humana foi considerada como uma causa provável dessa degradação.

Mais tarde Miranda (1983) localizou e caracterizou os principais efluentes líquidos descarregados directamente no rio Cértima e seus afluentes, o rio Levira e o rio da Serra, e também caracterizou o estado de eutrofização do rio Cértima. Foram identificadas as principais descargas em Ancas, Anadia e Mealhada. Verificou que o rio se encontrava bastante eutrofizado, principalmente na sua parte final, contudo referiu que o mesmo apresentava uma elevada capacidade autodepuradora, uma vez que as cargas de efluentes recebidas por este eram elevadas comparativamente com o seu caudal.

Rino e Gil (1987) incidiram o seu estudo sobre as diatomáceas, fazendo também análises físico-químicas das águas do rio Cértima em duas campanhas, Verão e Inverno. Concluíram que, no Verão, o rio se apresentava de um modo geral poluído, com algumas estações fortemente poluídas. Os baixos caudais em conjunto com as descargas de efluentes com baixo tratamento, provenientes sobretudo das indústrias vinícolas contribuíam para o elevado grau de poluição nessas estações. No Inverno, a qualidade da água era melhor devido aos caudais elevados que permitiam uma maior diluição de efluentes poluídos, sendo que as águas residuais das indústrias vinícolas eram menos abundantes nesta época.

Teixeira (1990) fez o seu estudo na qualidade de água e caracterizou as cargas poluentes do rio Cértima, analisando três amostras de efluentes industriais provenientes de duas indústrias vinícolas e uma indústria cerâmica. Verificou que o efluente da indústria cerâmica apresentava um valor de sólidos suspensos totais bastante elevado e que o efluente das indústrias vinícolas apresentavam valores mais elevados de carência bioquímica de oxigénio. Em relação ao rio, a autora concluiu que este estaria transformado no “esgoto da zona da Bairrada”, dado o seu elevado grau de poluição.

No estudo de Pereira *et al.* (1998), foram realçados os aspectos da qualidade das águas superficiais da região de Aveiro. Os autores analisaram trinta e cinco parâmetros físico-químicos em vinte e cinco amostras colhidas durante dois anos. Nove locais de amostragem deste estudo pertenciam à bacia do rio Cértima. O estudo revelou situações de elevada poluição na bacia, nomeadamente no rio Cértima e no rio Levira, devidas à elevada actividade agrícola e industrial da área, juntamente com a poluição introduzida pelas povoações existentes nas suas margens.

Reis (2000) estudou as condicionantes hidrogeológicas e antrópicas na mobilização de elementos poluentes nos rios Águeda e Cértima, o que envolveu o estudo dos sedimentos de corrente. Para isso definiu nove e dez locais de amostragem de amostragem nas sub-bacias do rio Águeda e do rio Cértima, respectivamente. Mostrou que a contaminação dos sedimentos era fortemente influenciada pela proximidade às fontes de poluição e pela variação no tempo do influxo do material. Verificou também que nos ambientes de baixa energia, propícios à acumulação de sedimentos finos e de matéria orgânica, como acontece em maior grau na sub-bacia do rio Cértima, as concentrações de metais nos sedimentos eram mais elevadas. Os resultados das análises químicas aos sedimentos revelaram teores médios em metais poluentes superiores no rio Cértima, mas com uma menor fracção potencialmente disponível do que no rio Águeda, levando à conclusão que o rio Cértima estaria menos poluído. No que diz respeito às características fluviais da sub-bacia, a autora distinguiu a influência das reacções de alteração química de rochas carbonatadas e silicatadas, onde predomina a fácies cálcica e a influência de contaminantes provenientes da poluição doméstica, agro-pecuária, sob a forma dos iões cloreto, sulfato e nitrato, cujo efeito era maior nesta sub-bacia do que na do rio Águeda.

Cerqueira *et al.* (2005) caracterizaram a qualidade da água da bacia hidrográfica do rio Cértima no Inverno, na Primavera e no Verão de 2003, através de parâmetros físico-químicos. Os resultados mostraram que a qualidade da água na Primavera era aceitável, no entanto, os valores mais elevados de fósforo total, azoto de Kjeldahl e CBO_5 no Verão, revelaram uma degradação significativa da qualidade da água, principalmente a jusante da cidade da Mealhada. Os autores apontaram, como principais causas, a existência de descargas de águas residuais domésticas e de escorrências de águas residuais pecuárias naquela zona. Foi ainda mencionado que estas descargas seriam a principal causa para a elevada carga de nutrientes das águas superficiais da bacia do rio

Cértima a partir do seu troço médio, tendo um provável impacto no estado trófico da Pateira de Fermentelos, localizada na parte final da bacia.

Manecas (2006) fez a caracterização geoquímica da área da bacia hidrográfica abrangida pelos municípios de Oliveira do Bairro e Anadia analisando os sedimentos da linha de água. Com a análise de mais de 500 amostras recolhidas em dois períodos distintos, a autora pretendeu relacionar os elementos de impacto ambiental Cu, Pb, Ni, Co, Cd, Zn, Fe, Mn e Cr com a sua origem. Verificou que o Co, o Ni, o Zn e o Cr, encontrados na zona Oeste da área de estudo e na sua parte mais antiga, a Este, constituída por xistos, conglomerados e o complexo Xisto-Grauváquico, se relacionavam com as zonas urbanas e industriais. Por outro lado, os elementos Cd e Cr, em oposição ao Mn, estariam ligados a factores antrópicos relacionados com a prática da agricultura. O Pb, em oposição ao Fe, estaria associado ao tráfego automóvel intenso, registado nas estradas N1 e N235, enquanto que o Fe estaria associado à litologia.

As interacções água subterrânea – água superficial na zona da Pateira de Fermentelos foram estudadas por Sena (2007) que efectuou análises químicas das águas, medições de níveis das massas de água superficial e subterrânea e medições de caudais. Através do balanço hídrico do sistema lagoa – aquífero freático, a autora demonstrou que a contribuição do rio Cértima para a água armazenada na Pateira de Fermentelos representa cerca de 90% das entradas na lagoa e ainda que a transferência de água do aquífero freático para a lagoa representa cerca de 90% das saídas deste. A autora concluiu que a composição físico-química da água da Pateira reflecte, principalmente, a composição da água drenada pela bacia do rio Cértima e, em menor escala, a contribuição dos aquíferos freáticos drenados e da ribeira do Pano. A qualidade da água e a eutrofização da lagoa deve-se principalmente às diversas pressões antrópicas que se desenvolvem sobre os aquíferos freáticos e ao longo da bacia do rio Cértima. Por outro lado, os processos hidrobiogeoquímicos, como a assimilação por parte da vegetação, a adsorção às partículas argilosas, a complexação com matéria orgânica, a co-precipitação com carbonatos, sulfatos e oxihidróxidos de ferro, que predominam na Pateira de Fermentelos e controlam a especiação de elementos, influenciam a qualidade da água da lagoa parecendo contribuir para a atenuação de contaminantes na mesma.

Ferreira (2007) fez a caracterização hidroquímica e da qualidade da água através de diversos parâmetros físico-químicos e um biológico. Seleccionou vinte e nove locais de amostragem ao longo da bacia identificando três fácies hidroquímicas principais. As águas das zonas de relevo mais acentuado e caracterizadas por rochas não

carbonatadas, apresentaram fácies dominada por cloreto, bicarbonato e sódio e valores baixos de sólidos dissolvidos totais. A restante bacia, caracterizada por fácies bicarbonatada-cálcica, revelou valores mais elevados de sólidos dissolvidos totais, resultantes, segundo a autora, da dissolução de rochas carbonatadas. As águas da ribeira do Pano, apresentaram-se bicarbonatadas-cloretadas, mostrando as distintas litologias do Cretácio e algumas influências de pressões antrópicas. Ainda concluiu que as baixas concentrações de alguns parâmetros na zona Este da bacia reflectiram a baixa pressão antrópica e a menor contribuição geológica nas características hidroquímicas desta zona. Os resultados demonstraram que a bacia do Cértima apresenta problemas de poluição, principalmente no troço a jusante da Mealhada e na Pateira de Fermentelos, estando a poluição relacionada com a diversa actividade industrial e agrícola na bacia, e as descargas de efluentes domésticos. Ferreira (2007) verificou ainda que os resultados de clorofila *a* comprovaram o estado eutrofizado da Pateira de Fermentelos.

Em 2008, Silva (2008) avaliou o estado da qualidade da água da bacia usando uma abordagem integrada caracterizando parâmetros biológicos e físico-químicos. Verificou que a zona Este da bacia (onde se localizam os locais de referência) apresentou os valores mais baixos de pH e uma menor concentração de sais em solução e que as comunidades de macroinvertebrados eram constituídas por uma vasta riqueza taxonómica de macroinvertebrados, reflectindo a maior diversidade registada nos locais amostrados. Os resultados mostraram que a zona mais crítica de poluição orgânica se encontrava no troço do rio Cértima a jusante da Mealhada, destacando-se a Lagoa Seca, onde diversos parâmetros químicos não respeitaram os objectivos ambientais de qualidade mínima para as águas superficiais. Relativamente à comunidade de macroinvertebrados, observaram-se valores de abundância e riqueza extremamente baixos na Lagoa Seca. Para além deste local, detectaram-se diferenças entre as comunidades dos locais de referência e dos restantes locais amostrados. A maioria destas diferenças foi relacionada com a poluição orgânica resultante das descargas pontuais e difusas na zona da cidade da Mealhada. No entanto, diferenças entre as características hidromorfológicas dos vários locais amostrados também pareceram contribuir significativamente para a distribuição e abundância relativa dos organismos pelas famílias. Silva (2008) ainda caracterizou todos os locais amostrados, com excepção dos locais de referência, como eutrofizados.

Estes estudos revelam pressões antrópicas na bacia hidrográfica do rio Cértima resultantes da elevada densidade populacional, de uma indústria dinâmica e uma

actividade agro-pecuária expressiva, inclusivamente na Pateira de Fermentelos que é parte integrante daquela bacia e se encontra classificada como uma Zona de Protecção Especial da Ria de Aveiro (Decreto-Lei N.º 384-B/99, de 23 de Setembro).

Torna-se assim essencial complementar estes estudos com uma avaliação ecotoxicológica dos recursos hídricos da bacia hidrográfica do rio Cértima para que se possa concluir sobre o verdadeiro impacto que estas pressões podem ter no ecossistema aquático.

1.5. Âmbito e objectivos

O objectivo principal desta dissertação foi a avaliação da qualidade da água do rio Cértima através de ensaios físico-químicos e ensaios ecotoxicológicos de forma a dar resposta à necessidade, estabelecida na Directiva – Quadro da Água (Directiva 2000/60/CE), de fixar normas de qualidade química através de bioensaios de forma a incluir a informação toxicológica para vários grupos taxonómicos (e.g. algas, dafnídeos). Foram escolhidos locais com impactos distintos de forma a verificar de que forma os ensaios ecotoxicológicos dão uma resposta adequada e permitem inferir acerca da qualidade de água. Tem também o objectivo de comparar os resultados obtidos com os estipulados pelo Decreto – Lei 236/98 de 1 de Agosto (Decreto-Lei 236/98) a fim de ser possível verificar o cumprimento do mesmo.

Para atingir estes objectivos foram feitos:

1. Ensaio físico-químico comparando os resultados com o Decreto – Lei 236/98.
2. Uma bateria de ensaios ecotoxicológicos com espécies pertencentes a diferentes níveis tróficos, nomeadamente com a bactéria *Vibrio fischeri*, com a alga verde *Pseudokirchneriella subcapitata*, com a macrófita *Lemna minor* e com o crustáceo *Daphnia magna*. Com estes ensaios obtiveram-se valores de toxicidade para cada local analisado.

Capítulo 2

Descrição da bacia hidrográfica do
rio Cértima

Capítulo 2 – Descrição da bacia hidrográfica do rio Cértima

2.1. Enquadramento geográfico

A bacia hidrográfica do rio Cértima está localizada na região Centro /Norte de Portugal Continental e encontra-se integrada na bacia hidrográfica do rio Vouga (figura 5), sendo esta a segunda maior bacia dos cursos de água que correm apenas em território nacional. Tem nascente na vertente Oeste da Serra do Buçaco, a sudeste da Mealhada, e a uma altitude de 380 m. No seu trajecto de cerca de 43 km atravessa os municípios da Mealhada, Anadia, Oliveira do Bairro e Águeda. No trecho final, o vale do rio Cértima abre-se numa lagoa natural, conhecida por Pateira de Fermentelos, voltando a estreitar imediatamente antes de desaguar no rio Águeda. A área ocupada pela sua bacia é de aproximadamente 540 km². O rio Cértima pode ser considerado como um rio de planície, uma vez que 90% da sua área de drenagem está situada abaixo dos 100 m (Ferreira, 2007; Silva, 2008).

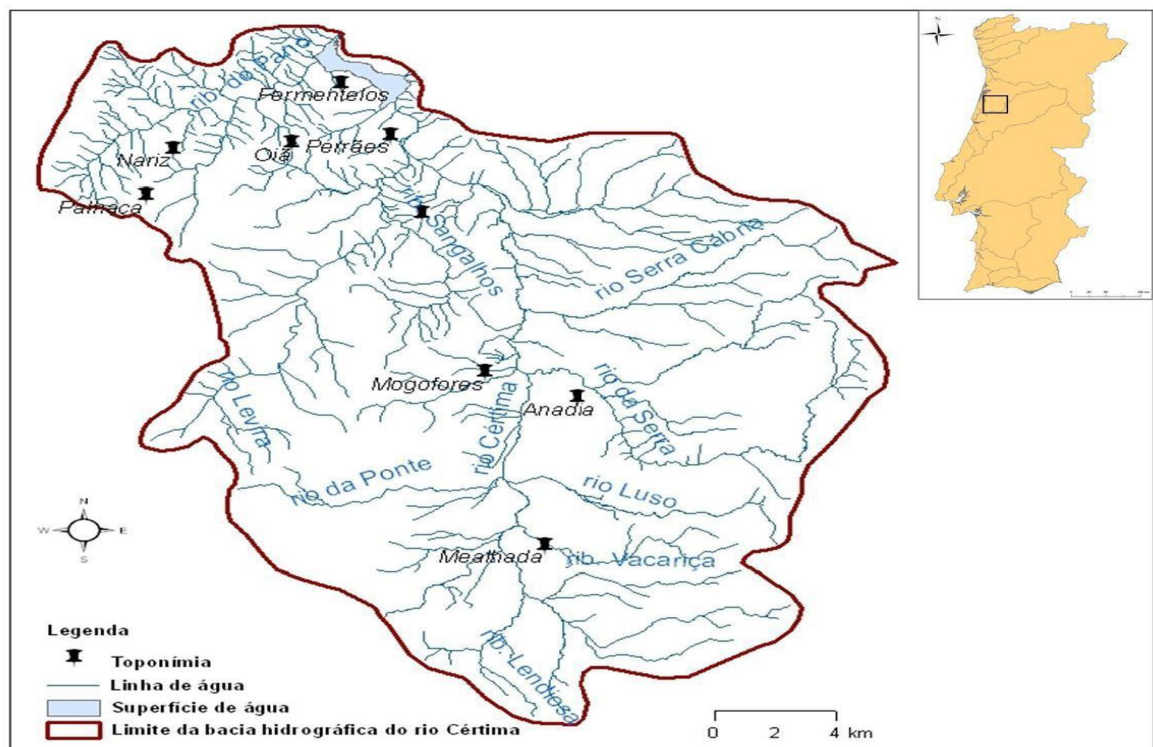


Figura 5 - Localização da sub-bacia do rio Cértima no território português (retirado de Silva, 2008).

A bacia hidrográfica do rio Cértima está localizada entre os paralelos 4460000 e 4495000 N e os meridianos 560000 E (coordenadas UTM) estando incluída na província da Beira Litoral e nas sub-regiões Baixo Vouga e Baixo Mondego.

2.2. Enquadramento fisiográfico

A zona da bacia hidrográfica do Cértima tem características topográficas, climáticas, geológicas e hidrológicas bastantes distintas.

O clima é mediterrâneo altamente influenciado pela proximidade do Oceano Atlântico. Tem Verões quentes e secos, com temperaturas máximas a atingir os 39 °C e com uma precipitação média de 40 mm e Invernos moderados e húmidos, com temperaturas que podem chegar a 0,6 °C, e com uma precipitação média de 158 mm (Ferreira, 2007). O rio Cértima apresenta um caudal médio de 27,32 m³/s com uma mediana de 6,71 m³/s. Os meses com menor caudal são os de menor precipitação, correspondentes ao Verão: Julho, Agosto e Setembro (Ferreira, 2007).

No que se refere ao relevo, na zona das serras do Caramulo e do Buçaco estão concentrados os declives mais acentuados, com valores superiores a 30% para cotas de terreno superiores a 300m. A restante área, compreendendo o vale do Cértima, tem cotas sempre inferiores a 70 m com declives que raramente ultrapassam os 5%, podendo às vezes situar-se entre os 5 e os 10%. O declive da linha de água principal é de 1,24% (Silva, 2008).

A geologia desta área compreende xistos Ordovicianos na zona superior leste da bacia e areias e argilas aluviais modernas na zona oeste, central e inferior.

2.3. Vegetação, ocupação do solo e seus efeitos nos recursos hídricos

Aproximadamente metade da área da bacia, 48%, é ocupada por florestas indiferenciadas, onde se incluem as espécies folhosas, resinosas e de mato que do ponto de vista hídrico apresentam comportamentos semelhantes, destacam-se as espécies *Pinus pinaster* e *Eucalyptus globulus*. As áreas ocupadas por este tipo de florestas normalmente não produzem poluição quer pontual, quer difusa. Trata-se de uma ocupação que exerce grande influência na distribuição da água da chuva, retardando a

sua chegada ao solo através de fenómenos de intercepção, escoamento pelos troncos e retenção na camada de restos orgânicos que cobre o solo, e consequentemente atrasa a velocidade de acumulação de água na superfície que contribui para a escorrência superficial (Ferreira, 2007; Consórcio ACADvF 2002)

A ocupação urbana corresponde a 7% deste território. Esta área é também ocupada por agricultura (44%, dos quais 27% são vinha), com culturas anuais e indiferenciadas (Cerqueira *et al.* 2005; Ferreira, 2007). Nesta zona podem ser encontradas culturas de regadios e de sequeiro e arrozais. As culturas de regadio e arrozais estão relacionadas com uma agricultura intensiva e indutora de poluição agrícola do tipo difuso e este tipo de ocupação é considerado um dos grandes consumidores de água da bacia. As culturas de sequeiro requerem agricultura extensiva e de subsistência, que não é, geralmente, muito utilizadora de agroquímicos. Verifica-se algum consumo de água utilizado em regas de complemento. Os índices de erosão são normalmente elevados devido ao não uso dos solos na época das chuvas mais intensas (Consórcio ACADvF 2002).

2.4. Caracterização socioeconómica

Os grandes centros urbanos (Mealhada, Anadia, Águeda e Oliveira do Bairro), com as suas respectivas zonas industriais, encontram-se junto do rio Cértima. A população residente é cerca de 85 000 habitantes, com uma densidade populacional média de 160 habitantes por km² (Cerqueira *et al.* 2005).

2.4.1. Actividades económicas

Estão incluídos nas actividades económicas os três sectores de actividade económica: o sector primário (agricultura, pecuária, actividades extractivas e exploração florestal), o sector secundário (produção industrial e agro-industrial, como as indústrias de transformação, construção e equipamentos) e o sector terciário (turismo, lazer e recreio). A tabela 1 mostra a distribuição da população activa nesses três sectores de actividade económica.

Tabela 1 - Distribuição da população activa, segundo o sector de actividade, nos concelhos principais da bacia do rio Cértima, 2001. Dados do Instituto Nacional de Estatística, 2006 (CCDR -C, 2008).

| Indicador | Águeda | Anadia | Mealhada | Oliveira do Bairro |
|---|--------|--------|----------|--------------------|
| População empregada, segundo o sector de actividade (%) | | | | |
| Primário | 2.1 | 6.8 | 4.6 | 7.9 |
| Secundário | 59,9 | 46.8 | 38 | 49.4 |
| Terciário | 38 | 46.5 | 57.4 | 42.7 |

Em Águeda, mais de metade da população activa trabalha no sector secundário, o que está relacionado com o grande número de pequenas e médias empresas fixadas na zona. A indústria metalo-mecânica e a produção de mobiliário metálico predominam a produção industrial. A prática agrícola é muito reduzida (CMA, 2007).

No concelho de Anadia prevalecem os sectores secundário e terciário devido à instalação de diversas indústrias bem como de estabelecimentos ligados a actividades turísticas, dentro e nas imediações do seu perímetro. No entanto, o sector primário também tem algum peso, sendo a viticultura a principal actividade agrícola. Estão presentes na zona duas vertentes industriais: uma ligada ao sector vinícola e outra ligada à indústria cerâmica e de materiais de construção. Também se encontram, neste concelho, actividades relacionadas com as artes gráficas, panificação e pastelaria, madeiras, carpintaria e mobiliário. Na área dos serviços há uma resposta eficaz e adequada às exigências do aglomerado (CMA, 1994).

Na Mealhada pouco mais de metade da população trabalha no sector terciário devido à actividade turística termal (Luso) e a restauração. Os sectores secundário e primário (prática de viticultura) também têm um peso considerável na população activa (CMM, 2008).

A percentagem de população activa que se dedica ao sector primário é maior no concelho de Oliveira do Bairro, sendo a produção de vinhos a actividade agrícola mais significativa. No entanto, é o sector secundário o predominante neste concelho, seguindo-se o sector terciário com diferença reduzida. São mais de 400 as empresas nesta

localidade, especialmente vocacionadas para a indústria cerâmica de grande dimensão e para a metalo-mecânica (CMO, 1994; CMO, 2010).

2.4.2. Infra-estruturas de saneamento básico

Os concelhos de Águeda, Anadia, Mealhada e Oliveira do Bairro são abastecidos, respectivamente, pelo sistema regional do Carvoeiro, os Serviços Municipalizados de Água e Saneamento de Anadia, a empresa Águas do Mondego, e a barragem de Quinta das Caínhas. Verifica-se que estes sistemas abrangem quase ou praticamente toda a população da zona.

O Sistema Municipal da Ria da Aveiro (SIMRIA) constitui uma solução integrada de recolha, tratamento e deposição final de efluentes líquidos nos concelhos de Águeda, Oliveira do Bairro, Albergaria-a-Velha, Aveiro, Estarreja, Ílhavo, Mira, Murtosa, Ovar e Vagos. No entanto, a maioria dos efluentes industriais da área em estudo, devido aos custos associados, não é enviada para este sistema, optando as indústrias pelo seu tratamento em unidades próprias, muitas vezes com baixas eficiências de tratamento, nomeadamente por recorrerem a fossas sépticas. Os efluentes são posteriormente lançados nas linhas de água, não havendo uma fiscalização eficaz das soluções adoptadas (Sena, 2007).

Na tabela 2 estão descritas as percentagens de população servida por infra-estruturas de saneamento básico: sistemas de abastecimento de água, sistemas de drenagem de águas residuais e estações de tratamento de águas residuais. Analisando a tabela observa-se que praticamente toda a população está abrangida por sistemas de abastecimento de águas. No que diz respeito aos sistemas de drenagem de águas residuais, o concelho de Anadia apresenta valores muito baixos, inferiores a 30%, o que pode representar graves problemas de degradação ambiental e de saúde pública, com a descarga de esgotos directamente para as linhas de água, para valas a céu aberto ou para fossas sépticas nem sempre em boas condições. Por outro lado, os concelhos da Mealhada e Oliveira do Bairro já apresentam valores de 95% e 87%, respectivamente.

Tabela 2 - População servida por infra-estruturas de saneamento básico referentes ao ano de 2001 (INE, 2005).

| Municípios | População servida por: | | |
|--------------------|---------------------------------------|--|---|
| | Sistemas de abastecimento de águas | Sistemas de drenagem de águas residuais | Estações de tratamento de águas residuais |
| | (%) | | |
| Águeda | 93 | 58 | 53 |
| Anadia | 100 | 27 | 21 |
| Mealhada | 100 | 95 | 95 |
| Oliveira do Bairro | 93 | 87 | 86 |

Capítulo 3

Material e Métodos

Capítulo 3 – Material e Métodos

3.1. Locais e datas de amostragem

Foram escolhidos três locais de amostragem na bacia hidrográfica do rio Cértima com características distintas no que diz respeito à influência das actividades humanas sobre a qualidade dos recursos hídricos superficiais. Esta escolha baseou-se em estudos anteriores que mostraram água de boa qualidade nas áreas de montanha situadas na faixa leste da bacia do Cértima e de baixa qualidade nas proximidades de alguns aglomerados populacionais (Cerqueira *et al.*, 2005; Ferreira, 2007; Silva, 2008).

O local Parada, seleccionado como referência em termos de qualidade da água, situa-se na ribeira de Trezói, imediatamente antes da sua confluência com o rio da Serra (um dos afluentes do rio Cértima), junto do lugar de Parada (Vila Nova de Monsarros, Anadia), onde a influência humana é praticamente nula (figura 6).



Figura 6 - Parada



Figura 7 - Lagoa Seca

O segundo local escolhido situa-se no curso principal do rio Cértima, no lugar de Lagoa Seca, imediatamente a jusante da Mealhada (figura 7), tendo apresentado, noutros estudos (Cerqueira *et al.*, 2005; Ferreira, 2007; Silva, 2008), uma carga poluente muito elevada, em consequência de descargas de esgotos, parcialmente tratados, da cidade da Mealhada e das águas residuais provenientes de uma quinta de gado bovino.

O terceiro local situa-se igualmente no curso principal do Cértima, no lugar do Repolão, a jusante de Oliveira do Bairro e não muito distante da confluência com a Pateira de Fermentelos (figura 8), com descargas de águas residuais domésticas e industriais a montante.



Figura 8 - Ponte do Repolão

A figura 9 mostra o posicionamento dos locais de amostragem na bacia hidrográfica do rio Cértima.

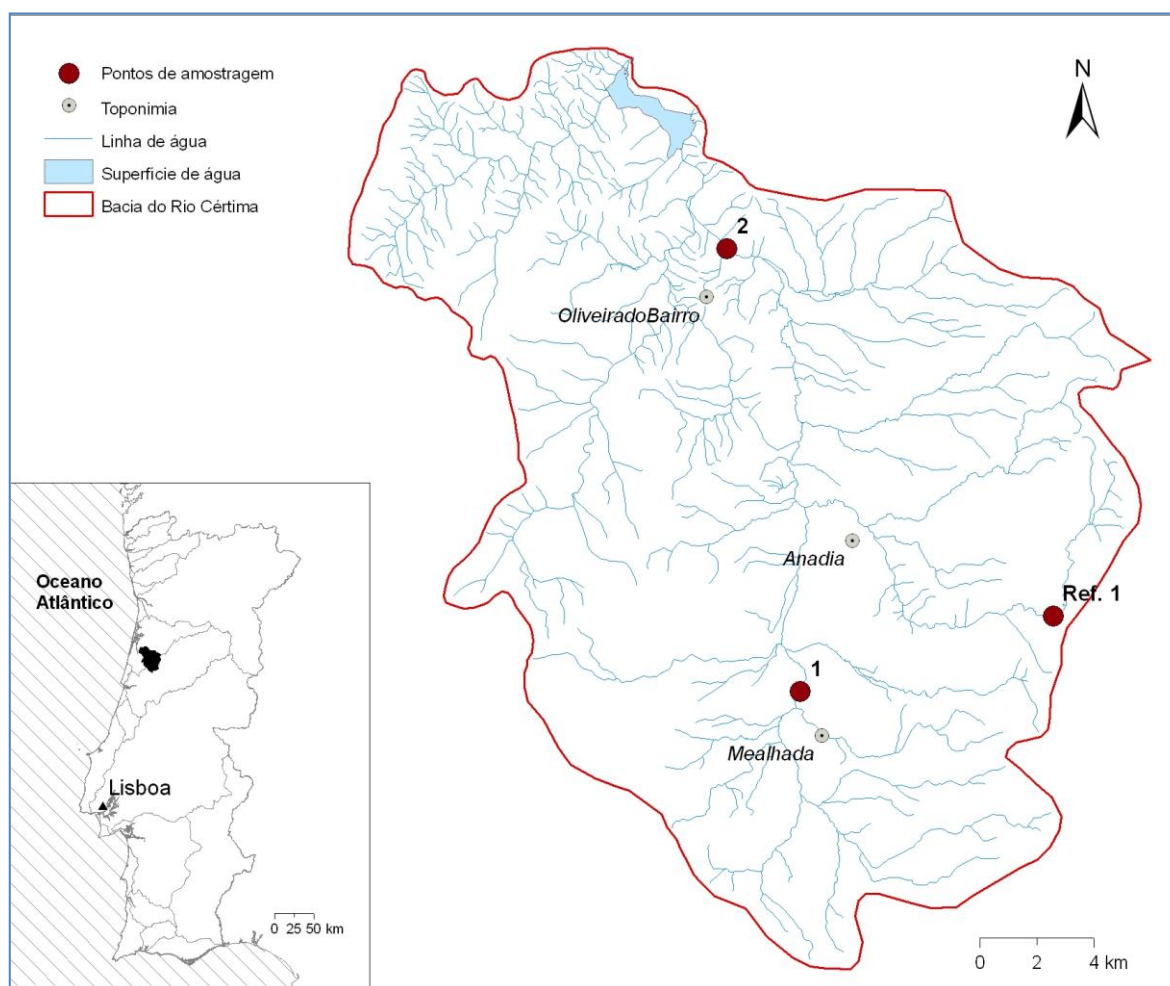


Figura 9 - Mapa com a identificação dos locais de amostragem na bacia hidrográfica do rio Cértima (Ref.1 – Parada; 1 – Lagoa Seca; 2 – Ponte do Repolão).

Com o objectivo de avaliar a variabilidade sazonal foram consideradas duas campanhas de amostragem em estações distintas: a primeira campanha foi efectuada a 3 de Novembro de 2009 e a 2ª campanha a 7 de Abril de 2010.

3.2. Parâmetros Físico-químicos

3.1.1. Amostragem e medições no campo

No campo foram medidos os parâmetros condutividade eléctrica, por meio de um medidor WTW 330i dotado de uma célula de grafite, oxigénio dissolvido e temperatura, por intermédio de um medidor WTW 330i equipado com um eléctrodo de membrana. Para os restantes parâmetros foram recolhidas em cada local 3 amostras independentes, através de um processo directo e apeado, usando como equipamento de recolha os próprios recipientes de armazenamento. Para a análise de carência bioquímica de oxigénio (CBO_5), sólidos suspensos totais e voláteis (SST e SSV) e nitratos foi utilizado uma garrafa de 2 L de polietileno lavada previamente em HCl. Esta amostra foi conservada no frio (4 °C). Para a análise do fósforo total a amostra foi recolhida num frasco de vidro de 250 mL e conservada com a adição de HCl no local de colheita. Foi também utilizado um frasco de vidro de 400 mL para a análise do azoto amoniacal e de nitratos sendo conservada no frio (4 °C).

3.1.2. Métodos Analíticos

Os parâmetros que não foram medidos no local foram determinados no laboratório do Departamento de Ambiente e Ordenamento da Universidade de Aveiro de acordo com APHA (1995).

No próprio dia da colheita foi determinado o pH, com o auxílio de um medidor de pH WTW, modelo 323, e iniciado o teste da CBO_5 pelo método manométrico. Deu-se igualmente início à determinação dos sólidos suspensos pelo método gravimétrico após filtração de um determinado volume de amostra. Depois de filtradas as amostras os filtros foram colocados na estufa a 105°C durante uma hora, pesados para a quantificação dos sólidos suspensos totais e depois colocados na mufla a 550°C durante 15 minutos para a quantificação dos sólidos suspensos voláteis. Para a determinação do fósforo total foi

utilizado o método do ácido ascórbico. Foi utilizado o método do azul de indofenol para a determinação do azoto amoniacal e o método de cromatografia iónica para os nitratos.

3.3. Ensaios ecotoxicológicos

Os ensaios ecotoxicológicos contemplaram uma bateria de bioensaios com organismos de diferentes níveis tróficos, nomeadamente com a bactéria *Vibrio fischeri*, com a macrófita *Lemna minor*, a alga *Pseudokirchneriella subcapitata* e o consumidor cladóceros *Daphnia magna*.

3.3.1. Amostragem

Para a realização dos bioensaios destinados à avaliação da ecotoxicidade da água foram recolhidos 20 L de amostra em cada local com recipientes de polietileno. As amostras foram transportadas à temperatura ambiente até ao laboratório, onde foram conservadas por congelação até à data da realização dos ensaios.

3.3.2. *Vibrio fischeri*

3.3.2.1. Teste Microtox® de toxicidade agudo

Para o teste 81.9% *basic test* foram efectuadas uma série de diluições em *cuvettes* seguindo o protocolo AE (1998), usando amostra, diluente Microtox® (solução de NaCl a 2%) e a solução Microtox® de ajuste osmótico (solução de NaCl a 22%) usada para ajustar a salinidade das amostras para os 2% requeridos pelo bioensaio (Blaise e Férard, 2005). Como a bactéria é conservada a -20°C foi adicionada a solução de reconstituição Microtox® imediatamente antes de cada grupo de ensaios. Depois das diluições e da adição da bactéria às *cuvettes* foi avaliada a toxicidade da amostra de água e calculada a redução de 50% de luminescência aos 5 e 15 minutos, usando o *Microtox Omni™ Software* (versão 4.3.0.1).

3.3.3. *Pseudokirchneriella subcapitata*

3.3.3.1. Cultura e Manutenção de organismos

Preparação do meio de cultura

O meio de cultura utilizado foi o *Woods Hole* MBL (MBL), preparado com água destilada, nutrientes e vitaminas, de acordo com o apresentado na tabela 3. Todos os compostos foram preparados com antecedência e armazenados a 4 °C. As vitaminas foram adicionadas depois do meio ter sido autoclavado. Depois de preparado o meio foi armazenado a 4 °C.

Tabela 3 - Composição química do meio de cultura MBL

| | Fórmula Química | Quantidade de composto para solução <i>stock</i> (g/L) | Volume retirado da solução <i>stock</i> por cada litro de meio (mL) |
|-----------------|--|--|---|
| Macronutrientes | CaCl ₂ 2H ₂ O | 36,760 | 1 |
| | MgSO ₄ 7H ₂ O | 36,970 | 1 |
| | NaHCO ₃ | 12,600 | 1 |
| | K ₂ HPO ₄ | 8,710 | 1 |
| | NaNO ₃ | 85,010 | 1 |
| | Na ₂ SiO ₃ 9H ₂ O | 28,420 | 1 |
| Micronutrientes | Na ₂ EDTA | 4,360 | 1 |
| | FeCl ₃ 6H ₂ O | 3,150 | 1 |
| | CuSO ₄ 5H ₂ O | 0,001 | 1 |
| | ZnSO ₄ 7H ₂ O | 0,022 | 1 |
| | CoCl ₂ 6H ₂ O | 0,010 | 1 |
| | MnCl ₂ 4H ₂ O | 0,180 | 1 |
| | Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O | 0,006 | 1 |
| Vitaminas (*) | Tiamina HCl (B ₁) | 0,1mg/l | |
| | Biotina (H) | 0,5 mg/l | |
| | Cianocobalamina (B ₁₂) | 0,5 mg/l | |
| | TRIS (hidroximetil aminometano) (**) | 50 g/200ml | 2 |

(*) só são adicionadas ao meio após a autoclavagem e arrefecimento

(**) o pH tem de ser ajustado a 7,2 a 20°C, adicionando HCl

Manutenção da cultura *P. subcapitata*

As culturas de algas foram feitas em garrações de 10 L, contendo um volume de 8 L de MBL. De modo a montar o sistema foram utilizados tubos com 6 e 3 mm de

diâmetro: um tubo ligado a uma pipeta de vidro para arejamento do meio, um outro tubo com a finalidade de transferência de meio; e um outro de tamanho reduzido para a saída do ar (com um pequeno filtro de gaze a obstruir a abertura), figura 10.

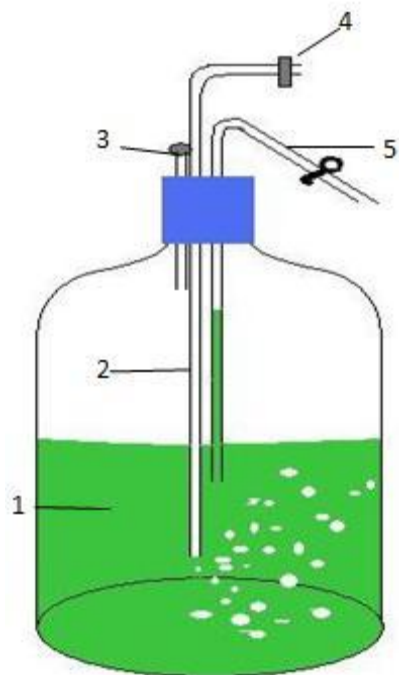


Figura 10 - Esquema representativo do sistema de cultura da alga *P. subcapitata*. 1 – Cultura de *P. subcapitata* em meio de cultura MBL; 2- Tubo de arejamento; 3- Tubo de saída de ar protegido com uma rolha de gaze; 4 – Filtro de 0,2 μm ; 5 – Tubo de transferência.

As culturas foram mantidas em câmaras climáticas (Modelo F10000 EDTU) com temperatura controlada ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) e sujeitas a um fotoperíodo de $16^{\text{L}}:8^{\text{D}}$. A cultura de *P. subcapitata* foi deixada em crescimento durante 5 dias, ou seja, foram feitos inóculos de 5 em 5 dias de forma a garantir que as culturas se encontravam na fase de crescimento exponencial.

3.3.3.2. Teste de inibição de crescimento

Os ensaios foram baseados nas normas EPA (2002) e OECD (2006). O bioensaio teve a duração de 96h e efectuou-se uma série de diluições de cada amostra em meio MBL como mostra a tabela 4. Na tentativa de eliminar efeitos relacionados com a falta de nutrientes nas amostras naturais, os ensaios foram realizados com a amostra natural sem nutrientes (100%) e com adição de nutrientes segundo a formulação do meio MBL (100%+N).

Tabela 4 - Diluições efectuadas para o teste de inibição do crescimento de *P. subcapitata*

| | Controlo | 12,5% | 25% | 50% | 75% | 100% | 100%+N* |
|---------------|----------|-------|-----|-----|-----|------|---------|
| Amostra (mL) | 0 | 5 | 10 | 20 | 30 | 40 | 40 |
| Meio MBL (mL) | 40 | 35 | 30 | 20 | 10 | 0 | 0 |

*os nutrientes utilizados foram uma mistura de micro nutrientes e macro nutrientes, colocando 0,04 mL de micronutrientes e macronutrientes e 0,08 mL de TRIS.

Os ensaios foram feitos em *erlenmeyers* de 100 mL, tendo sido consideradas 3 réplicas para cada concentração. Em cada frasco foi colocado um volume de algas de modo a que a concentração inicial fosse de 10^4 células/mL. Feitas as diluições e adicionadas as algas os testes foram postos em constante agitação (100 r.p.m. num agitador orbital Edmund Bühler GmbH® KS-15) nas mesmas condições das culturas. No fim do ensaio foi determinada a densidade celular utilizando uma câmara de Neubauer. Para a contagem das células foi usado um microscópio Olympus CKX41 com uma ampliação total de 400x.

Com base no protocolo 201 da OECD (2006) foram determinados a taxa de crescimento (equação 1) e a percentagem de inibição da taxa de crescimento (equação 2).

Equação 1

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(X_j) - \ln(X_i)}{t_j - t_i}$$

onde, μ_{i-j} é a taxa de crescimento específico, X_i e X_j correspondem à biomassa no tempo i e j, respectivamente, e t é o período de tempo desde i até j.

Equação 2

$$\%I_r = \frac{\mu_c - \mu_T}{\mu_c} \times 100$$

onde, $\%I_r$ é a percentagem de inibição da taxa de crescimento, μ_c é o valor médio de μ no controlo e μ_T é o valor médio de μ no tratamento.

3.3.4. Ensaio com *Lemna minor*

3.3.4.1. Cultura e manutenção de organismos

Preparação do meio de cultura

Para a manutenção de culturas preparou-se um meio líquido de crescimento (meio Steinberg) com água destilada e nutrientes nas quantidades apresentadas na tabela 5. As soluções de nutrientes foram feitas com antecedência e armazenadas a 4 °C. A solução foi autoclavada antes de ter sido adicionada a solução 8 para evitar a desnaturação da mesma. Depois de ter sido preparado, o meio de cultura foi armazenado a 4 °C.

Tabela 5 - Composição química dos macronutrientes e micronutrientes do meio de cultura Steinberg

| | Fórmula Química | Quantidade de composto para solução <i>stock</i> (g/L) | Volume retirado da solução <i>stock</i> por cada litro de meio (mL) |
|-----------------|---|--|---|
| Macronutrientes | <u>Solução 1:</u> | | |
| | KNO ₃ | 17,50 | 20 |
| | KH ₂ PO ₄ | 4,50 | |
| | K ₂ HPO ₄ | 0,63 | |
| | <u>Solução 2:</u> | | |
| | MgSO ₄ · 7H ₂ O | 5,00 | 20 |
| | <u>Solução 3:</u> | | |
| | Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O | 14,75 | 20 |
| Micronutrientes | <u>Solução 4:</u> | | |
| | H ₃ BO ₃ | 120,0 | 1 |
| | <u>Solução 5:</u> | | |
| | ZnSO ₄ · 7H ₂ O | 180,0 | 1 |
| | <u>Solução 6:</u> | | |
| | Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O | 44,0 | |
| | <u>Solução 7:</u> | | |
| | MnCl ₂ · 4H ₂ O | 180,0 | |
| | <u>Solução 8:</u> | | |
| | FeCl ₃ · 6H ₂ O | 760,00 | 1 |
| | EDTA disódio desidratado | 1500,00 | |

Manutenção da cultura *L. minor*

Para a manutenção da cultura de *L. minor* os indivíduos foram mantidos em *erlenmeyers* de 250 mL devidamente tapados com algodão envolto em gaze (de modo a evitar contaminação). Foi feita uma renovação 2 vezes por semana transferindo os organismos para novos recipientes (autoclavados) contendo meio Steinberg. As culturas foram mantidas em câmaras climáticas (Modelo F10000 EDTU) com temperatura controlada ($20\pm 2^{\circ}\text{C}$) e sujeitas a um fotoperíodo de $16^{\text{L}}:8^{\text{D}}$. Os *erlenmeyers* foram devidamente etiquetados.

3.3.4.2. Teste de inibição do crescimento

Os ensaios basearam-se nas normas EPA (2002) e OECD (2006). O bioensaio teve a duração de 7 dias e efectuou-se uma série de diluições de cada amostra em meio Steinberg como mostra a tabela 6. Na tentativa de eliminar efeitos relacionados com a falta de nutrientes nas amostras naturais, os ensaios foram realizados com a amostra natural sem nutrientes (100%) e cm adição de nutrientes segundo a formulação do meio Steinberg (100%+N).

Tabela 6 - Diluições efectuadas para o teste de inibição do crescimento de *Lemna minor*

| | Controlo | 12,5% | 25% | 50% | 75% | 100% | 100%+N* |
|---------------------|----------|-------|-----|-----|-----|------|---------|
| Amostra (mL) | 0 | 12,5 | 25 | 50 | 75 | 100 | 100 |
| Meio Steinberg (mL) | 100 | 87,5 | 75 | 50 | 25 | 0 | 0 |

*os nutrientes utilizados foram uma mistura de micro nutrientes e macro nutrientes, colocando 100 μL /100mL de micro nutrientes e 2000 μL /100mL de cada um dos 3 macronutrientes

Por cada concentração foram consideradas 3 réplicas, colocando 3 indivíduos de 3 frondes cada por frasco. As condições de realização dos testes foram idênticas às das culturas ($20\pm 2^{\circ}\text{C}$; $16^{\text{L}}:8^{\text{D}}$). Não foi feita nenhuma renovação de meio durante o período de duração do teste.

Foram registados em cada réplica, no início e no fim do ensaio, o número de frondes e o peso seco (g). Para a determinação da taxa de crescimento de *L. minor* foi

utilizado o parâmetro peso seco e não o número de folhas, já que o peso seco considera a totalidade da biomassa ao invés da contagem do número de folhas.

Com base no protocolo 221 de OECD (2006) foram calculados, para cada um dos parâmetros, a taxa de crescimento específico (equação 1) e a respectiva percentagem de inibição da taxa de crescimento específico (equação 2).

$$\text{Equação 1} \quad \mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

onde μ_{i-j} é a taxa de crescimento específico, N_i e N_j correspondem à variável medida na réplica no tempo i e j , respectivamente, e t é o período de tempo desde i até j .

$$\text{Equação 2} \quad \%I_r = \frac{\mu_c - \mu_T}{\mu_c} \times 100$$

onde, $\%I_r$ é a percentagem de inibição da taxa de crescimento específico, μ_c é o valor médio de μ no controlo e μ_T é o valor médio de μ no tratamento.

3.3.5. *Daphnia magna*

3.3.5.1. Cultura e manutenção de organismos

Preparação do meio de cultura

Para a manutenção de culturas preparou-se um meio de cultura sintético denominado de ASTM *hard water* (ASTM, 1980), com água destilada e com os compostos químicos apresentados na tabela 7. Algumas soluções dos compostos químicos foram feitas com antecedência, a partir de soluções *stock*, e armazenadas a 4 °C. Depois de ter sido preparado, o meio de cultura ASTM foi colocado em bidões de plástico de 20 L.

Tabela 7- Composição química do meio de cultura sintético ASTM *hard water* e suas características físicas (adaptado de ASTM, 1980)

| Fórmula Química | Quantidade de composto para solução <i>stock</i> (g/L) | Quantidade de composto para 2 L de solução concentrada (g) | Volume de solução concentrada para 20 L de meio de cultura (mL) |
|-------------------------------------|--|--|---|
| NaHCO ₃ | 19,20 | 38,40 | 200 |
| MgSO ₄ 7H ₂ O | 24,57 | 49,14 | 200 |
| KCl | 0,80 | 1,60 | 200 |
| CaSO ₄ 2H ₂ O | 2,40 | Preparar no momento | |
| Tiamina HCl (B ₁) | 0,150/100 mL | Um microtubo com 1 mL de uma mistura de vitaminas guardado no congelador | |
| Cianocobalamina (B ₁₂) | 0,002/100 mL | | |
| Biotina (H) | 0,0015/100 mL | | |
| pH=7,8±0,2 | | | |

Alimento utilizado e aditivo orgânico (extracto de algas)

Como alimento foi utilizada a alga *P. subcapitata*, cultivada em sistema de crescimento contínuo em laboratório (ver secção 3.3.3.1). O volume de alimento foi adicionado ao meio de cultura de modo a obter uma concentração de 3×10^5 células/ml/dia. De forma a preparar o alimento, as culturas de algas foram centrifugadas a 10 000 rpm durante 5 minutos. Após este tempo o sobrenadante (MBL) foi retirado e o resíduo ressuspensionado com ASTM. Esta suspensão, ASTM, foi diluída numa proporção de 1:10 e lida a absorvância a 440 nm (espectrofotómetro Spectronic® 20 Genesys™), usando ASTM com branco. A absorvância foi depois acertada para valores entre 0,400 e 0,900, de modo a possibilitar o cálculo do volume de alimento a adicionar aos frascos de cultura de *D. magna*. Em conjunto com o alimento foi adicionado extracto da alga marinha *Ascophyllum nodosum* como aditivo orgânico (Baird *et al.*, 1989b). O volume de extracto foi adicionado ao meio de cultura de acordo com a tabela 8.

Tabela 8 - Volume de extracto adicionado ao meio de cultura consoante o volume de ASTM

| Volume de ASTM (ml) | Volume da solução <i>stock</i> de extracto de algas (mL) |
|---------------------|--|
| 25 | 0,1 |
| 800 | 3,2 |

Manutenção da cultura *Daphnia magna*

Para a manutenção da cultura de *D. magna* foram mantidos cerca de 40 indivíduos em frascos de 800 mL de modo a garantir um número suficiente de neonatos para a realização dos testes. Foi feita uma renovação do meio de 2 em 2 dias transferindo os organismos para novos recipientes contendo ASTM, alimento (*Pseudokirchneriella subcapitata*) e extracto orgânico (ASTM 1980). As culturas foram mantidas em câmaras climáticas (Modelo F10000 EDTU) com temperatura controlada ($20\pm 2^{\circ}\text{C}$) e sujeitas a um fotoperíodo de 16^L:8^D. Todos os frascos foram devidamente etiquetados. Após o nascimento da 3ª ninhada os juvenis eram transferidos para um novo recipiente com meio de cultura fresco, permitindo a renovação da cultura.

3.3.5.2. Teste de reprodução

Foram realizados testes crónicos com base nas normas EPA (2002) e OECD (1998). Para este bioensaio foi feita uma série de diluições da amostra em meio ASTM como mostra a tabela 9:

Tabela 9 - Diluições efectuadas para o teste de reprodução de *D. magna*

| | Controlo | 12,5% | 25% | 50% | 75% | 100% |
|----------------|----------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Amostra (mL) | 0,000 | 3,125 | 6,250 | 12,500 | 18,750 | 25,000 |
| Meio ASTM (mL) | 25,000 | 21,875 | 18,750 | 12,500 | 6,250 | 0,000 |

Foram utilizados 60 neonatos em cada ensaio (para cada local de amostragem) retirados das culturas-mães. Os indivíduos utilizados eram neonatos com menos de 24 h nascidos entre a terceira e a 5ª ninhada. Por cada concentração foram consideradas 10

réplicas, colocando um indivíduo separado em cada frasco de 50 mL. O meio de cultura e alimento foram renovados a cada 2 dias. As condições de realização dos testes foram idênticas às das culturas (20 ± 2 °C; $16^L:8^D$). Este teste foi dado por terminado quando pelo menos 60% dos indivíduos do controlo libertaram a 3ª ninhada.

Os organismos foram observados diariamente com o objectivo de remover os mortos, efectuar a sua contagem e registar a ocorrência de ninhadas. Os parâmetros registados ao longo do teste foram a mortalidade, crescimento dos organismos de teste (mães), idade à primeira reprodução e número de neonatos por ninhada.

O crescimento das mães foi determinado ao longo do teste através da medição do comprimento do 1º exopódito da 2ª antena da *exuvia*, figura 11, com a ajuda de uma ocular micrométrica calibrada (lupa Olympus SZX9). Esta medição foi feita no início do teste, aquando o nascimento da primeira ninhada e finalmente aquando o nascimento da 3ª ninhada.

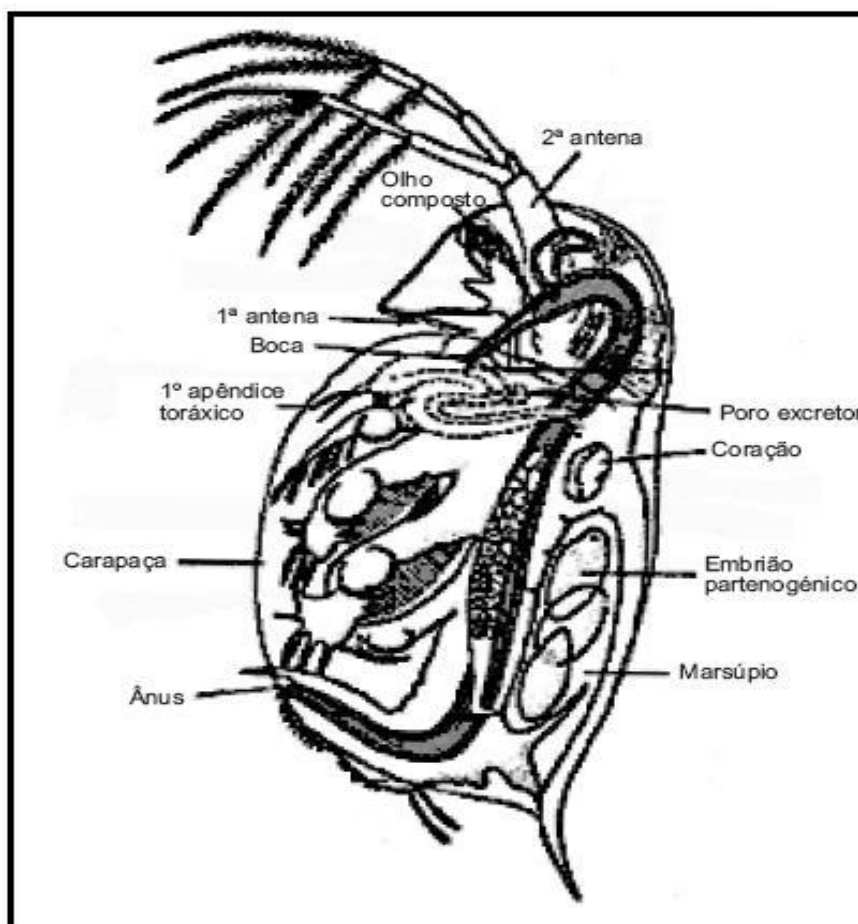


Figura 11 - Esquema da anatomia de *D. magna* (adaptado de Cooney, 1995)

Com base nos parâmetros medidos foram determinados a taxa de crescimento diário (dia^{-1}) (TCD) (equação 1), que analisa o crescimento somático das mães e a taxa de crescimento intrínseco (dia^{-1}) (r), que integra idade de maturação, o número de neonatos e idade em cada ninhada. r foi calculada com base usando a equação de Euler-Lotka (equação 2) (Meyer et al., 1986).

$$\text{Equação 1} \quad TCD = \frac{(\ln(N_f) - \ln(N_i))}{t}$$

onde, N_f é o tamanho final das mães, N_i é o tamanho inicial das mães e t o número de dias de duração do teste.

$$\text{Equação 2} \quad \sum_{x=\alpha}^w l_x e^{-rx} m_x = 1.0$$

onde, l_x é a probabilidade de sobrevivência à idade x , m_x é a fecundidade cumulativa à idade x , α é a idade à maturidade e w é a máxima idade em que houve reprodução.

3.3.6. Análise Estatística

Foi feita uma análise de regressão Probit a fim de estimar a concentração que causaria 50% de redução, EC_{50} :

- a) no crescimento de *L. minor*,
- b) na reprodução de *D. magna*,
- c) da luminescência de *V. fischeri*,
- d) no crescimento de *P. subcapitata*.

Para avaliar se existiam ou não diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as amostras testadas e o controlo, efectuou-se uma ANOVA unifactorial seguida de um teste de Dunnet. A partir dos resultados obtidos foram determinados o LOEC (concentração com menor efeito observável) e o NOEC (concentração com nenhum efeito observável) (Zar, 1996).

Para além dessas análises foi também efectuado um teste t de student a fim de verificar se existiam diferenças significativas entre os resultados obtidos entre a concentração de 100% e a concentração de 100% com adição de nutrientes nos ensaios com plantas.

Capítulo 4

Resultados e Discussão

Capítulo 4 – Resultados e Discussão

4.1. Qualidade físico-química da água

4.1.1. Parâmetros organolépticos

A tabela 10 apresenta a descrição dos parâmetros organolépticos verificados em cada local de amostragem nas duas campanhas de monitorização. Nos locais Parada e Ponte do Repolão não foi detectado cheiro, cor nem espuma em nenhuma das campanhas. No entanto, o local Lagoa Seca apresentou problemas de cheiro, cor e espuma que poderão ser devidos a descargas de águas residuais não tratadas com origem doméstica e agro-pecuária. Da análise da tabela, verifica-se ainda que não ocorreram mudanças temporais significativas em relação a estes parâmetros, com a excepção do local Lagoa Seca, onde se registou uma diminuição do cheiro e da cor entre Novembro de 2009 e Abril de 2010.

Tabela 10 - Descrição dos parâmetros organolépticos verificados nas duas campanhas de monitorização em cada local de amostragem.

| Parâmetros organolépticos | | | | | | |
|---------------------------|------------------|---------------|------------------|---------------|------------------|---------------|
| Local | Cheiro | | Cor | | Espuma | |
| | Novembro 2009 | Abril 2010 | Novembro 2009 | Abril 2010 | Novembro 2009 | Abril 2010 |
| Parada | Ausência | Ausência | Ausência | Ausência | Ausência | Ausência |
| Lagoa Seca | Intensa | Ligeira | Intensa | Ligeira | Ausência | Ausência |
| Ponte do Repolão | Ausência | Ausência | Ausência | Ausência | Ausência | Ausência |

4.1.2. Parâmetros físico-químicos

Nas figuras 12, 13, 14 e 15 está representada a variação dos parâmetros físico-químicos monitorizados neste estudo. Para além dessa variação estão também representados os objectivos ambientais de qualidade mínima para as águas superficiais, conforme constam no anexo XXI do Decreto-Lei 236/98, de 1 de Agosto. Como neste anexo não são definidos os valores máximos admissíveis para o nitrato, a condutividade e os sólidos suspensos totais, estes foram comparados com os valores do anexo I, do mesmo decreto, que estabelece os critérios de qualidade das águas doces superficiais destinadas à produção de água para consumo humano. Foi escolhido este anexo uma vez que é aquele que apresenta os critérios mais rigorosos para a qualidade de águas superficiais, ou seja, se os mínimos legais forem respeitados neste anexo serão também respeitados em todos os restantes. No anexo A estão descritos os valores máximos admissíveis (VMA) e os valores máximos recomendados (VMR) para os parâmetros em estudo.

A temperatura da água (figura 12) variou entre 14,1°C e 18,1°C na campanha de 3 de Novembro de 2009 e entre 12,4°C e 14,3°C na campanha de 7 de Abril de 2010, com valores mínimos nas águas de maior altitude e sujeitas a maior ensombramento resultante da presença de vegetação ripícola (local Parada) e valores máximos no troço mais a jusante com menor altitude e ausência de vegetação ripícola provocando maior incidência solar (locais Ponte do Repolão e Lagoa Seca). Quando comparados com a legislação, que prevê um VMA de 30°C, todos os valores obtidos encontram-se em cumprimento.

A condutividade eléctrica mostrou uma variação acentuada entre os locais de amostragem (figura 12). Os valores mais elevados parecem estar relacionados com a maior influência de efluentes agrícolas/pecuários e/ou domésticos ao longo do rio Cértima, ocorrendo nas proximidades dos principais agregados populacionais, podendo estar ainda associados às formações rochosas (Ferreira, 2007). Por oposição, os valores mais baixos foram registados em áreas onde é menor a influência antropogénica e onde são menos relevantes as fontes de poluição, designadamente na zona mais a Este da bacia, onde, no passado, já se tinham encontrado os valores mais baixos de sais em solução (Silva, 2008). O menor valor registado foi de 130,58 $\mu\text{S}/\text{cm}$ no local Parada, na campanha de 7 de Abril de 2010, e o valor máximo foi de 1036,38 $\mu\text{S}/\text{cm}$ no local Lagoa Seca, na campanha de 3 de Novembro de 2009, o que sugere um impacto significativo das descargas de águas residuais nesta zona. Verificou-se, nos três locais, uma diminuição de condutividade entre Novembro e Abril. Isto poderá ser, em parte, explicado

pelo aumento do caudal e diminuição da temperatura. Quando comparados os valores obtidos com os constantes na legislação verifica-se que apenas o local Lagoa Seca, na campanha de Novembro, apresenta um valor superior aos 1000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ estipulados na lei.

Os valores de pH (figura 12) não mostraram variações significativas. Na campanha de 3 de Novembro de 2009 variaram entre 6,74 (local Parada) e 7,62 (local Lagoa Seca) e na campanha de 7 de Abril de 2010 variaram entre 6,97 (local Referência) e 7,72 (local Lagoa Seca). Houve um ligeiro aumento do pH, nos três locais de amostragem, entre a 1ª e a 2ª campanha. Todas as amostras em ambas as campanhas cumprem o estabelecido na legislação.

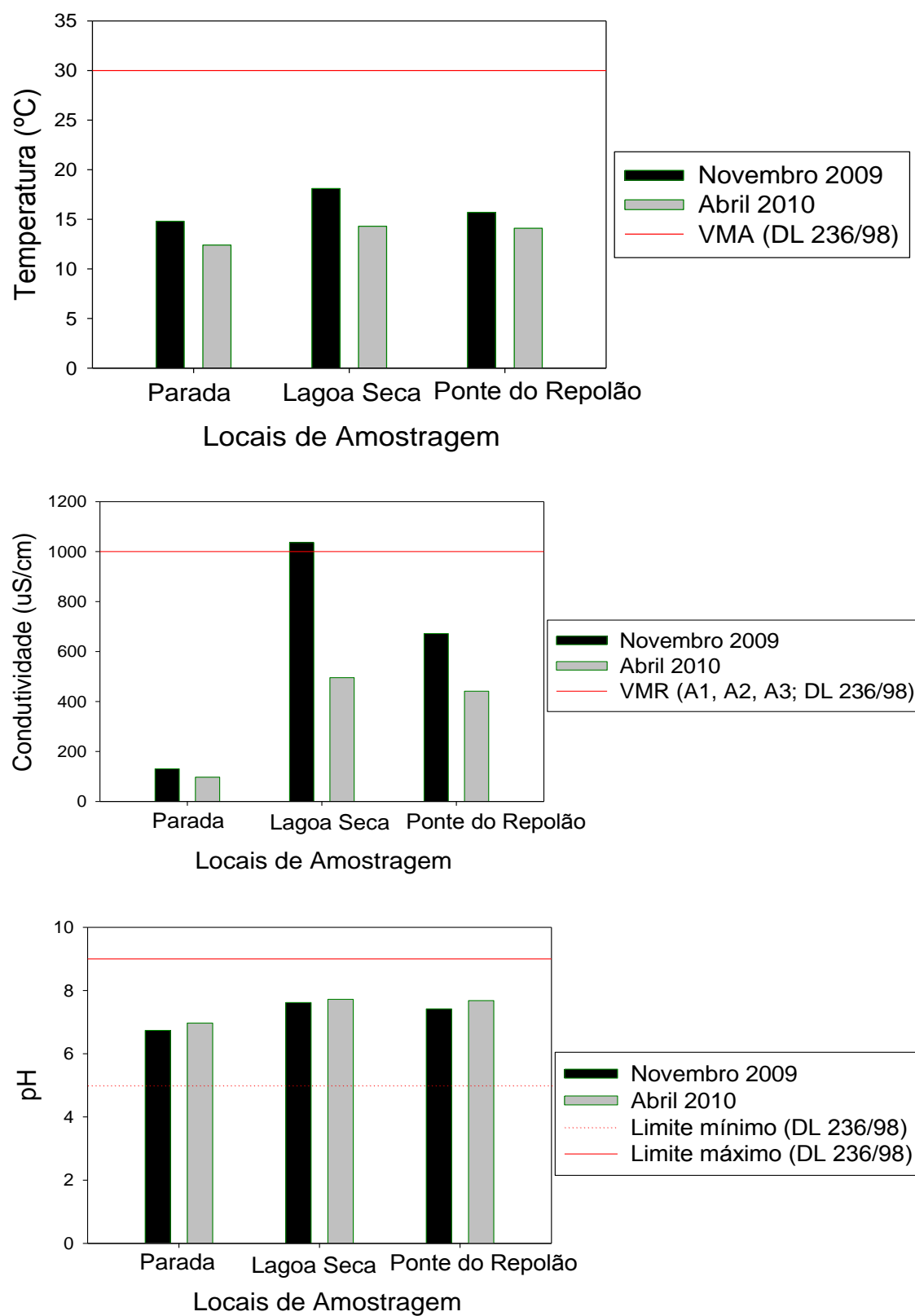


Figura 12 - Variação da temperatura da água (°C), condutividade (μS/cm) e pH em cada local de amostragem nas duas campanhas de amostragem.

Os valores de oxigénio dissolvido (figura 13) indicaram, na campanha de 3 de Novembro de 2009 águas bem oxigenadas para o local Parada (9,87 mg/L), águas pouco oxigenadas no local Ponte do Repolão (4,95 mg/L) e concentrações extremamente baixas no local Lagoa Seca (0,35 mg/L). Observou-se uma subida considerável das concentrações de oxigénio dissolvido na campanha de 7 de Abril de 2010, nos três locais, com valores a variarem entre 8,37 mg/L e 10,66 mg/L. A legislação considera o valor limite de 50% para a percentagem de saturação em oxigénio dissolvido. Em Novembro apenas o local Parada cumpriu a legislação. No entanto, na campanha de Abril todos os locais apresentavam valores em conformidade com a legislação.

Os valores de CBO_5 em Novembro (figura 13) revelaram uma elevada contaminação de matéria orgânica no local Lagoa Seca, com valores de 40,0 mgO_2/L . Este resultado revela a ocorrência de um elevado conteúdo de matéria orgânica (a decomposição da matéria orgânica é feita através de bactérias aeróbias que utilizam o oxigénio dissolvido para a síntese celular e respiração) que poderá ser atribuído à combinação do baixo caudal com descargas de águas residuais não tratadas provenientes da cidade da Mealhada e escurrimentos provenientes de uma exploração pecuária localizada a sudoeste do local (Cerqueira *et al.*, 2005). Este valor foi mais baixo na campanha de Abril, 7 mgO_2/L , podendo dever-se ao aumento de caudal, ou seja, ao aumento da capacidade de diluição da água. No local Ponte do Repolão também se verificou uma diminuição no CBO_5 entre as duas campanhas. Pelo contrário, no local Parada verificou-se um aumento, passando de 0 mgO_2/L para 4 mgO_2/L . No entanto, é possível que tenha havido contaminação da amostra, na 2ª campanha, uma vez que o oxigénio dissolvido é de 100%. Os valores medidos nas duas campanhas nos locais Parada e Ponte do Repolão cumprem o valor limite de 5 mgO_2/L estabelecido na legislação. O local Lagoa Seca não cumpre o VMA em nenhuma das duas campanhas.

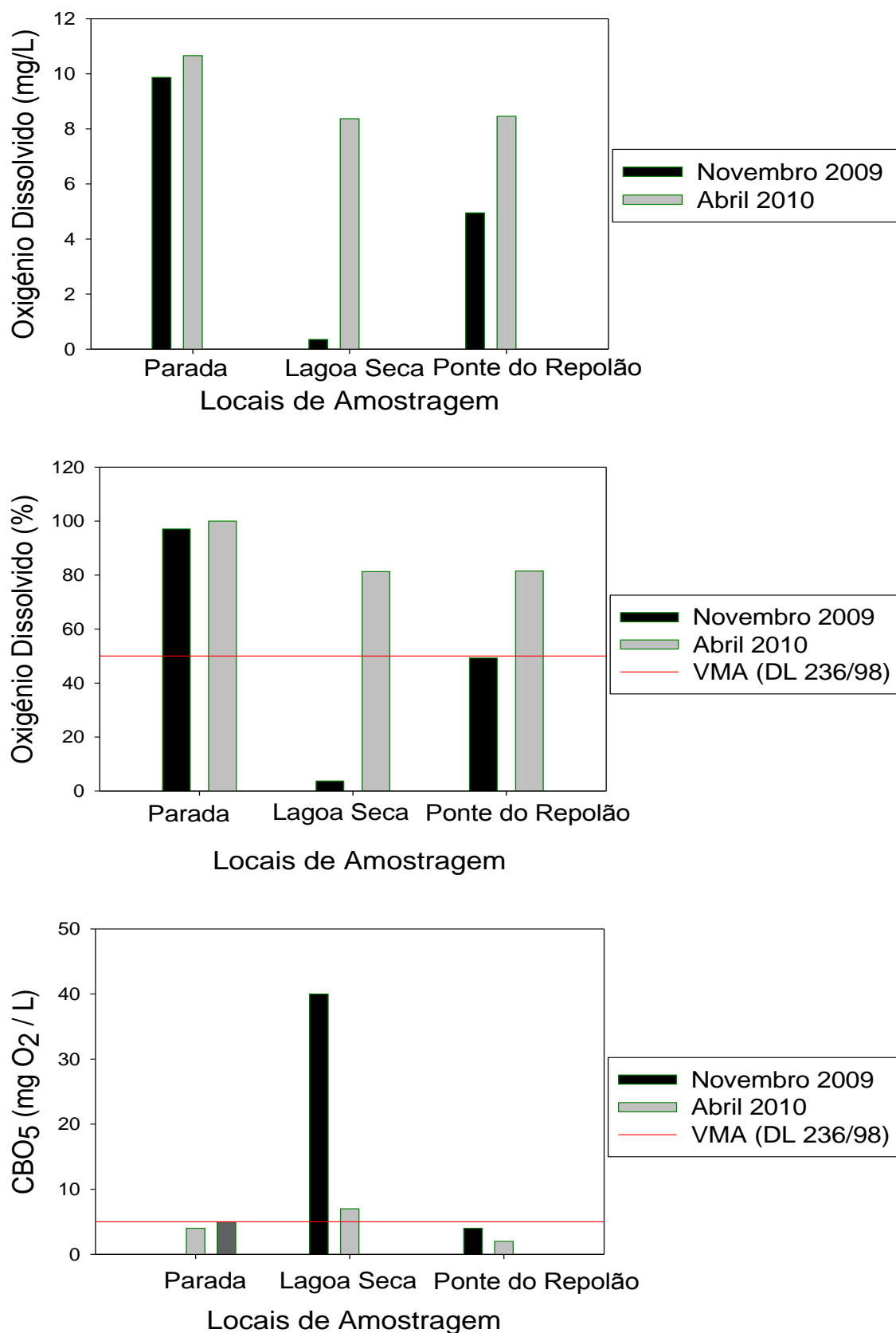


Figura 13 - Variação da concentração de oxigênio dissolvido (mg/L), percentagem de saturação em oxigênio dissolvido (%) e carência bioquímica de oxigênio (mg O₂/L) em cada local de amostragem nas duas campanhas de amostragem.

Analisando os valores de sólidos suspensos (figura 14), o local que apresenta os níveis de concentração maiores é a Lagoa Seca, seguido de Ponte do Repolão e Parada. No local Ponte do Repolão observou-se uma subida tanto dos valores dos sólidos suspensos totais como dos sólidos suspensos voláteis entre a 1ª e a 2ª campanha. Os valores medidos no local Lagoa Seca e Ponte Repolão podem ser explicados pelas descargas de águas residuais não tratadas com origem doméstica, industrial e agropecuária. No entanto, todos os locais apresentam valores inferiores ao valor estabelecido, VMR, na legislação, 25 mg/L.

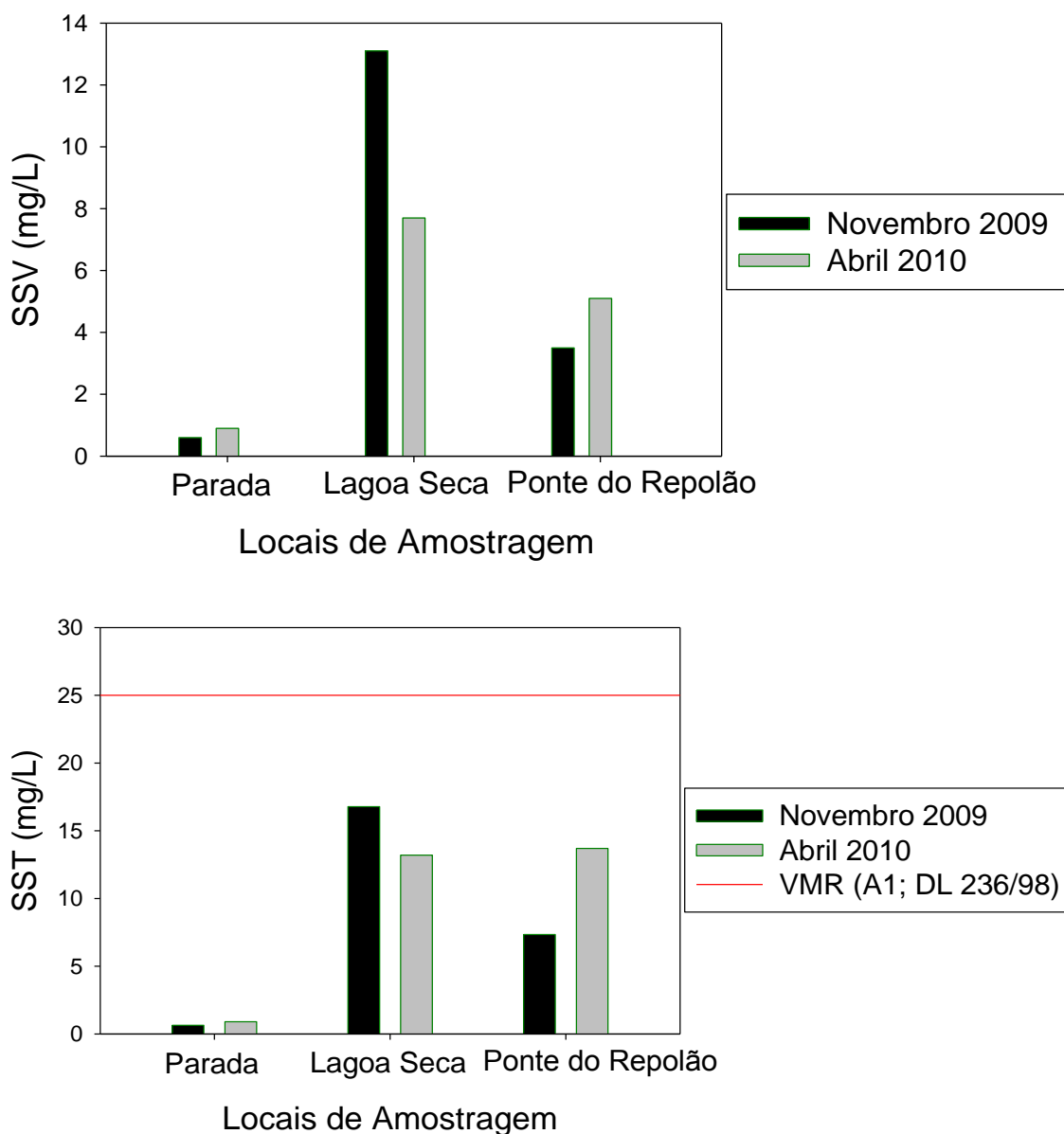


Figura 14 - Variação dos Sólidos Suspensos Totais e Voláteis (mg/L) em cada local de amostragem nas duas campanhas de amostragem.

Na figura 15 estão apresentadas as variações de fósforo, nitrato e azoto amoniacal nas duas campanhas de amostragem.

O valor mais elevado de fósforo verificou-se em Novembro de 2009 no local Lagoa Seca. Este valor deveu-se, possivelmente, às descargas de águas residuais da cidade da Mealhada, uma vez que o fósforo é um constituinte dos detergentes domésticos e não é libertado em quantidades significativas pelos animais (Cerqueira *et al.*, 2005). No entanto, em Abril de 2010, observou-se uma concentração de fósforo neste local de 30 vezes menor. Por sua vez, no local Ponte do Repolão também se verificou uma diminuição da concentração, embora menos acentuada do que no local anterior. Esta diminuição pode ser explicada pelo aumento de caudal nesses locais. Por outro lado, no local Parada e em ambas as campanhas, a concentração de fósforo total esteve sempre abaixo do limite de detecção da técnica de análise. A legislação prevê um VMA de 1mgP/L que foi ultrapassado apenas no local Lagoa Seca na campanha de Novembro.

O azoto amoniacal presente nos cursos de água reflecte, geralmente, a ocorrência de águas residuais não tratadas de origem doméstica e agro-pecuária. O seu valor mais elevado foi detectado no local Lagoa Seca em Novembro de 2009 que, como já foi referido, é um local exposto a importantes descargas de águas residuais. Verifica-se também uma diminuição significativa entre Novembro e Abril. Os outros dois locais apresentam valores de azoto amoniacal praticamente nulos. Apenas o local Lagoa Seca, nas duas campanhas, não cumpre o VMA de 1 mg N/L.

O nitrato apresentou um acréscimo das concentrações entre os locais Lagoa Seca e Ponte do Repolão, o qual se relaciona com a oxidação gradual do azoto amoniacal e de outras formas de azoto na forma reduzida lançadas no rio em grandes quantidades na zona da Mealhada. Também em relação a este parâmetro se observou uma diminuição das concentrações da 1ª para a 2ª campanhas, associada ao maior caudal de água drenada pelo rio. No entanto, em nenhuma campanha os valores obtidos são superiores aos valores legislados. Os nitratos são fundamentais para o crescimento do plâncton utilizado por muitas espécies de peixe na sua alimentação no entanto não devem ser excessivos uma vez que podem contribuir para eutrofização e consequentemente afectar a preservação e desenvolvimento da vida aquática (Smith *et al.*, 1999).

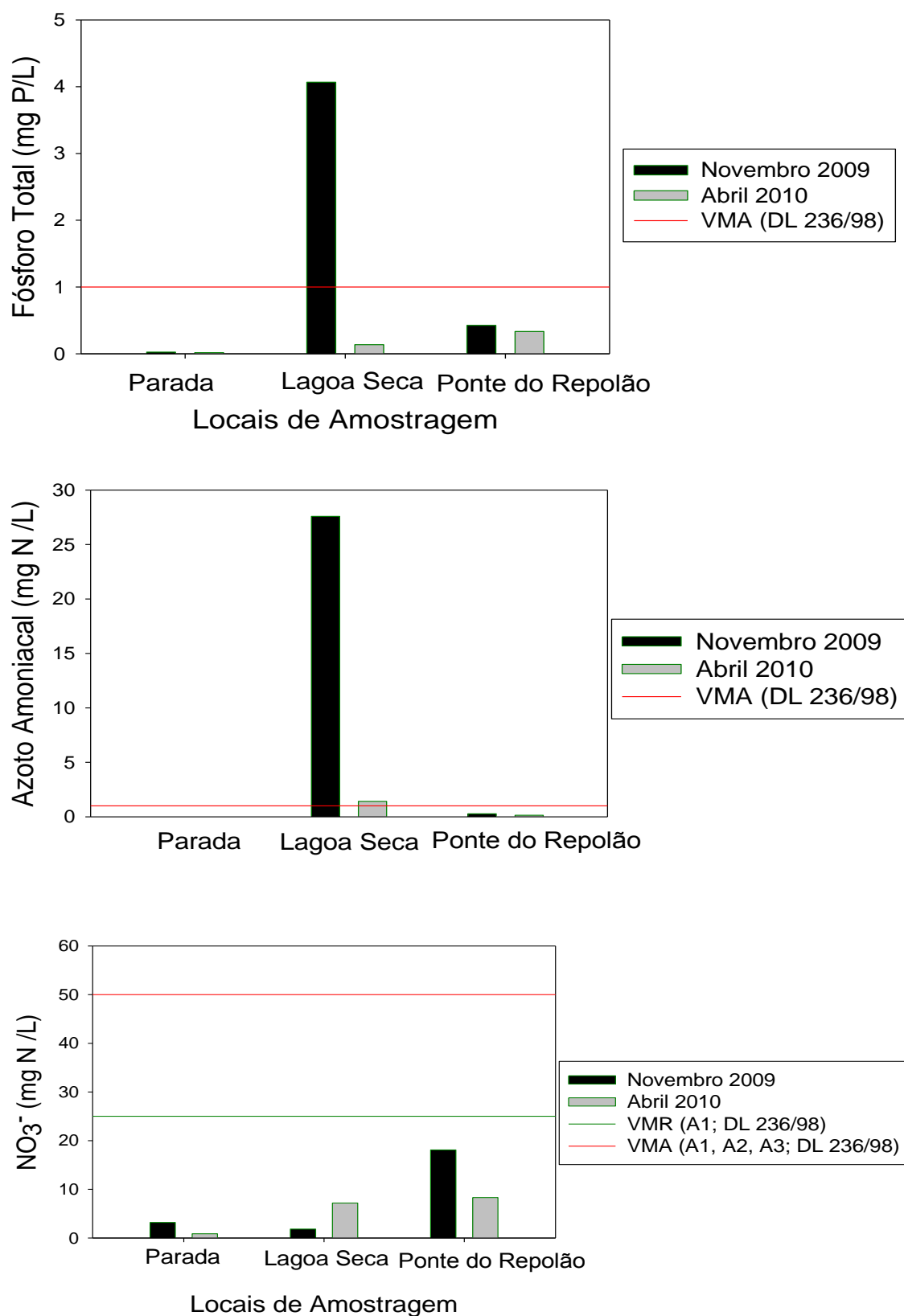


Figura 15 - Fósforo Total (mg P/L), azoto amoniacal (mg N/L) e NO₃⁻ (mg N/L) em cada local de amostragem nas duas campanhas de amostragem.

4.1.3. Classificação do estado trófico

Estão descritas, na tabela 10, as concentrações dos parâmetros utilizados para avaliar o estado trófico da água: fósforo total e azoto total e é apresentada a classificação do estado trófico de acordo com os critérios de Dodds *et al.*(1998) (anexo B). É preciso salientar que a concentração de azoto total não foi medida, por isso os valores apresentados representam o somatório das concentrações de azoto amoniacal e de nitrato, que será sempre inferior à concentração total de azoto.

Analisando a tabela 11 podemos concluir que em ambas as campanhas os locais Lagoa Seca e Ponte do Repolão são classificados como eutróficos. Em relação ao local Parada, este é classificado como oligotrófico em todas as campanhas com a excepção do parâmetro azoto na 1ª campanha, que classificou o local como eutrófico.

Tabela 11 - Estado trófico a 3 de Novembro de 2009 e a 7 de Abril de 2010.

| | | | | Estado Trófico | |
|---------------|------------------|-----------------------|----------------------|----------------|--------------|
| | Local | N- Total | P- Total | N | P |
| | | (mg/m ³)* | (mg/m ³) | | |
| Novembro 2009 | Parada | 3188,35 | 24,70 | Eutrófico | Oligotrófico |
| | Lagoa Seca | 29414,08 | 4067,18 | Eutrófico | Eutrófico |
| | Ponte do Repolão | 18371,74 | 424,83 | Eutrófico | Eutrófico |
| Abril 2010 | Parada | 579,12 | 15,81 | Oligotrófico | Oligotrófico |
| | Lagoa Seca | 5189,78 | 136,03 | Eutrófico | Eutrófico |
| | Ponte do Repolão | 4482,06 | 333,66 | Eutrófico | Eutrófico |

*Corresponde apenas à soma das concentrações de azoto amoniacal e de nitrato.

4.2. Avaliação ecotoxicológica

4.2.1. Ecotoxicidade para *Vibrio fischeri*

Na figura 16 podemos observar os valores de inibição de luminescência para a bactéria *V. fischeri* nas campanhas de Novembro 2009 e de Abril de 2010. Na 1ª campanha, apenas foi observada inibição no local Ponte do Repolão, tendo a mesma aumentado aos 15 minutos. Assim, foi o único local que apresentou toxicidade com EC_{50} de 44,85% (33,90 – 64,85) aos 5 minutos e aumentou a toxicidade aos 15 minutos com um EC_{50} de 6,95% (tabela 12). Como os efeitos tóxicos detectados se situam num local a jusante de descargas de água residual doméstica e industrial (inclusivamente indústria metalúrgica) e existe uma actividade vitivinícola considerável na bacia será pertinente efectuar uma análise química para detectar possíveis metais ou pesticidas ao nível da coluna de água, a fim de correlacionar a sua presença com os efeitos observados. Nos outros dois locais para além de não ter havido toxicidade foi possível observar uma estimulação da luminescência da bactéria.

Em relação à campanha de Abril de 2010, ao contrário da 1ª campanha, praticamente não foi verificada inibição em nenhum dos locais de amostragem, não se verificando, por isso, toxicidade, $EC_{50} > 100\%$ (tabela 12). Nesta campanha, nos três locais amostrados, foi possível observar estimulação da luminescência da bactéria. A diferença na percentagem de inibição, verificada no local Ponte do Repolão entre as duas campanhas, pode ser devida ao aumento do caudal e, por conseguinte, à diminuição da concentração dos tóxicos.

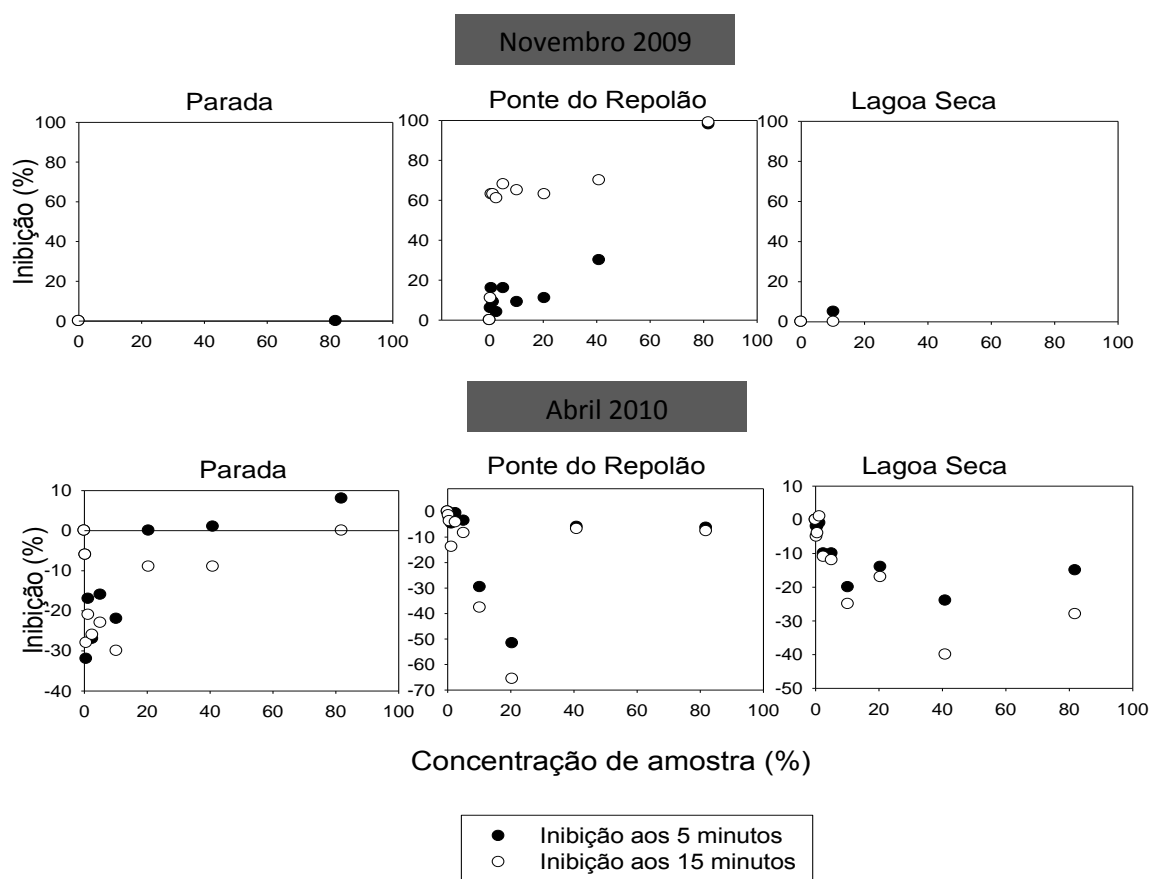


Figura 16 - Inibição de luminescência para *V. fischeri* em cada local de amostragem nas duas campanhas.

Tabela 12 - Síntese dos valores de EC_{50} em percentagem de amostra para 95% de confiança para a inibição de luminescência de *V. fischeri*.

| Parâmetro | Campanha | Local de Amostragem | EC_{50} | |
|---------------------------|---------------|---------------------|-----------------------|--------|
| | | | 5 min | 15 min |
| Inibição de luminescência | Novembro 2009 | Parada | >100 | >100 |
| | | Ponte do Repolão | 44,85 (33,90 – 64,85) | 6,95 |
| | | Lagoa Seca | >100 | >100 |
| | Abril 2010 | Parada | >100 | >100 |
| | | Ponte do Repolão | >100 | >100 |
| | | Lagoa Seca | >100 | >100 |

4.2.2. Ecotoxicidade para *Pseudokirchneriella subcapitata*

Na figura 17 e na tabela 13 estão resumidos os efeitos das amostras de água na taxa de crescimento (dia^{-1}) e os valores de NOEC, LOEC e EC_{50} determinados para *P. subcapitata* nas duas campanhas. Na campanha de Novembro de 2009 foram detectadas diferenças significativas no local Parada ($p < 0,05$) em todas as concentrações tendo o LOEC correspondido à concentração de amostra de 12,5%. No entanto, existiram diferenças significativas ($p < 0,001$) entre a concentração de 100% e a concentração 100% com adição de nutrientes (tabela 14) o que indica que o efeito observado no 100% se deveu à falta de nutrientes na amostra natural recolhida no local Referência. De facto, as concentrações de azoto e fósforo observadas no local Parada foram inferiores às definidas como óptimas no protocolo OECD (2006), sendo as mesmas 3,927 mg N/L e 0,285 mg P/L. Ainda na campanha de Novembro, o local Lagoa Seca apresentou um LOEC correspondente à concentração de amostra de 75%, não ocorrendo diferença significativa entre 100% e 100% + nutrientes. Este efeito poderá estar relacionado com o alto teor de azoto amoniacal, que na sua forma não-ionizada ($\text{NH}_3\text{-N}$) é capaz de provocar efeitos adversos em algumas espécies de algas (Källqvist e Svenson, 2003; Mucha *et al.*, 2003) e à grande concentração de sólidos que dificulta a passagem de luz, essencial para o crescimento da alga. Por outro lado, o local Ponte do Repolão, na campanha de Novembro de 2009, não apresentou diferenças significativas em nenhuma concentração, possivelmente devido ao alto teor de nutrientes presentes nesse local. Em relação à campanha de Abril, apenas se observaram diferenças significativas no local Parada, na concentração 100% (LOEC), tendo um EC_{50} de 99,88% (78,66-174,65). Como referido anteriormente, esta diferença deveu-se à falta de nutrientes pois, à semelhança da 1ª campanha existiram diferenças significativas ($p = 0,006$) entre a concentração de 100% e a concentração 100% com adição de nutrientes (tabela 14), tendo havido aumento da taxa de crescimento na amostra com adição de nutrientes. Para além dessa diferença, na 2ª campanha, as concentrações de azoto e fósforo também estiveram abaixo das definidas como ótimas no protocolo OECD (2006)

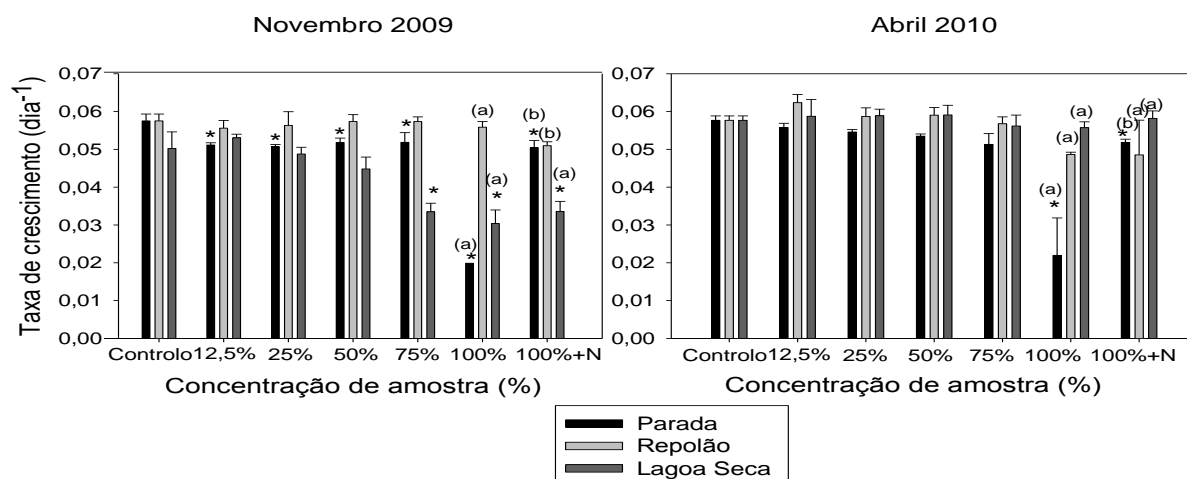


Figura 17 - Taxa de crescimento (dia^{-1}) determinada para *P. subcapitata* quando exposta às diferentes amostras de água recolhidas em Novembro de 2009 e em Abril de 2010. As barras de erro indicam o erro padrão, os asteriscos indicam diferenças significativas entre concentrações e o controlo ($p < 0.05$) e as letras indicam diferenças significativas entre a concentração 100% e a concentração 100%+N. (100%+N corresponde à concentração 100% com adição de nutrientes segundo a formulação do meio MBL).

Tabela 13 - Resumo da análise de variância simples (ANOVA unifactorial) feita às diferenças na taxa de crescimento (dia^{-1}) de *P. subcapitata* entre diferentes concentrações de cada amostra e controlo, dos valores de NOEC e LOEC e síntese dos valores de EC_{50} em percentagem de amostra para 95% de confiança para a taxa de crescimento de *P. subcapitata* na amostra sem adição de nutrientes (100%) e com adição de nutrientes (100%+N)

| | Local de amostragem | df | MS_{res} | F ratio | H | p | NOEC | LOEC | EC_{50} | |
|---------------|---------------------|----|--------------------------|---------|--------|--------|------|-------|-------------------------|--------|
| | | | | | | | | | 100% | 100%+N |
| Novembro 2009 | Parada | 6 | 4,66E-04 | 211,29 | - | <0,001 | - | 12,5% | >100 | >100 |
| | Ponte do Repolão | 6 | 1,77E-06 | 0,436 | - | 0,843 | - | - | >100 | >100 |
| | Lagoa Seca | 6 | 2,61E-04 | 31,33 | - | <0,001 | 50% | 75% | >100 | >100 |
| Abril 2010 | Parada | 6 | - | - | 15,941 | 0,014 | 75% | 100% | 99,88 (78,66-174,65) | >100 |
| | Ponte do Repolão | 6 | - | - | 15,19 | 0,019 | - | - | >100 | >100 |
| | Lagoa Seca | 6 | 5,40E-06 | 0,838 | - | 0,561 | - | - | >100 | >100 |

Tabela 14 – Resumo do teste t de student de comparação das taxas de crescimento (dia^{-1}) de *P. subcapitata* entre a concentração de 100% e 100% com adição de nutrientes.

| | Local de amostragem | df | t | p |
|---------------|---------------------|----|---------|--------|
| Novembro 2009 | Parada | 4 | -28,008 | <0,001 |
| | Ponte do Repolão | 4 | 4,587 | 0,01 |
| | Lagoa Seca | 4 | -1,241 | 0,282 |
| Abril 2010 | Parada | 4 | -5,215 | 0,006 |
| | Ponte do Repolão | 4 | 0,0165 | 0,988 |
| | Lagoa Seca | 4 | -1,694 | 0,166 |

4.2.3. Ecotoxicidade para *Lemna minor*

Na figura 18 e na tabela 15 estão resumidos os efeitos das amostras de água na taxa de crescimento (dia^{-1}) e os valores de EC_{50} determinados para *L. minor* nas duas campanhas de amostragem. Podemos observar que na campanha de Novembro de 2009 não foram detectadas diferenças significativas em nenhum dos locais de amostragem. Por outro lado, na campanha de Abril de 2010 já se observaram diferenças significativas ($p < 0,05$) nos locais Parada e Repolão. No local Parada o NOEC correspondeu à concentração de 75% e o LOEC de 100%. O facto da concentração 100% com adição de nutrientes não ter apresentado diferenças significativas em relação ao controlo sugere que a diferença observada no 100% se deveu à falta de nutrientes na amostra natural recolhida no local Parada. De facto, a concentração de azoto neste local esteve em ambas as campanhas (sendo mais baixa na 2ª campanha) abaixo de 4-8 mg N/L sugerido por Landolt e Kandeler (1987) como condição óptima para o crescimento de *L. minor*. No local Repolão, o NOEC correspondeu à concentração de amostra de 50% e o LOEC à concentração de amostra de 75%. Considerando que neste local as concentrações de nutrientes (em especial NO_3^- e P), ao contrário do local Parada, não foram um factor limitante ao crescimento desta planta, a inibição observada poderá ser

explicada pela presença de substâncias tóxicas (e.g. metais, pesticidas). Além disso, as diferenças significativas ($p < 0.05$) observadas entre a amostra sem adição de nutrientes (100%) e com adição de nutrientes (100%+N) (tabela 16), podem indicar que em elevadas concentrações os nutrientes podem mascarar possíveis efeitos de substâncias tóxicas, como já reportado em estudos anteriores (Lozano e Pratt, 1994). No local Lagoa Seca não foram detectadas diferenças significativas em nenhuma das campanhas de amostragem, no entanto, houve uma diminuição da taxa de crescimento em Novembro 2009. Neste caso, a diminuição não se deveu à falta de nutrientes uma vez que a taxa de crescimento na concentração de 100% com adição de nutrientes se manteve semelhante à concentração de 100% sem adição de nutrientes não se observando diferenças significativas entre elas (tabela 16). Pelo contrário, na 2ª campanha a taxa de crescimento manteve-se constante. Esta diferença poder-se-á dever ao aumento de caudal e consequente diluição de substâncias tóxicas.

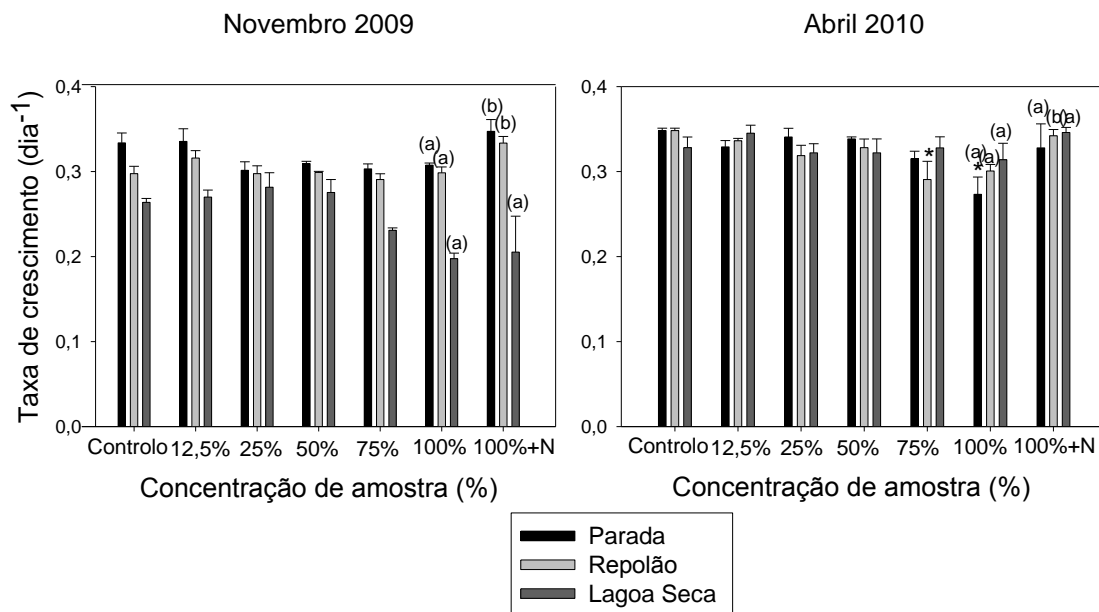


Figura 18 - Taxa de crescimento (dia^{-1}) determinada para *L. minor* quando exposta às diferentes amostras de água recolhidas em Novembro de 2009 e em Abril de 2010. As barras de erro indicam o erro padrão, os asteriscos indicam diferenças significativas entre concentrações e o controlo ($p < 0.05$) e as letras indicam diferenças significativas entre a concentração 100% e a concentração 100%+N. (100%+N corresponde à concentração 100% com adição de nutrientes segundo a formulação do meio Steinberg)

Tabela 15 - Resumo da análise de variância simples (ANOVA unifactorial) feita às diferenças na taxa de crescimento (dia^{-1}) de *L. minor* entre diferentes concentrações de cada amostra e controlo, valores de NOEC e LOEC e síntese dos valores de EC_{50} em percentagem de amostra para 95% de confiança para a taxa de crescimento de *L. minor* na amostra sem adição de nutrientes (100%) e com adição de nutrientes (100%+N)

| | Local de amostragem | df | MS_{res} | F ratio | H | p | NOEC | LOEC | EC_{50} | |
|---------------|---------------------|----|--------------------------|---------|-------|-------|------|------|------------------|--------|
| | | | | | | | | | 100% | 100%+N |
| Novembro 2009 | Parada | 6 | 1,04E-03 | 3,68 | - | 0,021 | - | - | >100 | >100 |
| | Ponte do Repolão | 6 | 6,56E-04 | 4,88 | - | 0,007 | - | - | >100 | >100 |
| | Lagoa Seca | 6 | - | - | 14,06 | 0,029 | - | - | >100 | >100 |
| Abril 2010 | Parada | 6 | 1,88E-03 | 2,99 | - | 0,043 | 75% | 100% | >100 | >100 |
| | Ponte do Repolão | 6 | 1,26E-03 | 3,54 | - | 0,024 | 50% | 75% | >100 | >100 |
| | Lagoa Seca | 6 | 4,37E-04 | 0,85 | - | 0,555 | - | - | >100 | >100 |

Tabela 16 - Resumo do teste t de student para comparação das taxas de crescimento (dia^{-1}) de *L. minor* entre a concentração de 100% e 100% com adição de nutrientes.

| | Local de amostragem | df | t | p |
|---------------|---------------------|----|--------|-------|
| Novembro 2009 | Parada | 4 | -2,836 | 0,047 |
| | Ponte do Repolão | 4 | -3,388 | 0,028 |
| | Lagoa Seca | 4 | -0,184 | 0,863 |
| Abril 2010 | Parada | 4 | -1,569 | 0,192 |
| | Ponte do Repolão | 4 | -3,917 | 0,017 |
| | Lagoa Seca | 4 | -1,576 | 0,190 |

4.2.4. Ecotoxicidade para *Daphnia magna*

Na figura 19 e tabela 17 são apresentados os efeitos das amostras de água na TCD e os valores de EC_{50} determinados. Apenas foram encontradas diferenças significativas ($p < 0,05$) no local Lagoa Seca, em Novembro de 2009, com um NOEC correspondente à concentração de amostra de 25% e um LOEC correspondente à concentração de amostra de 50%. No entanto, estas diferenças são devidas a um aumento na estimulação da TCD à medida que aumenta a concentração de amostra. Também se observou um ligeiro aumento da taxa de crescimento diário no local Ponte do Repolão, possivelmente devido à presença de partículas nutritivas dissolvidas e algas nas amostras de água recolhidas nesses locais. O local Parada não apresentou diferenças significativas em nenhuma concentração nem em nenhuma das campanhas. Para além de não se ter observado toxicidade em nenhum local observou-se inclusivé estimulação nos locais Lagoa Seca e Ponte do Repolão.

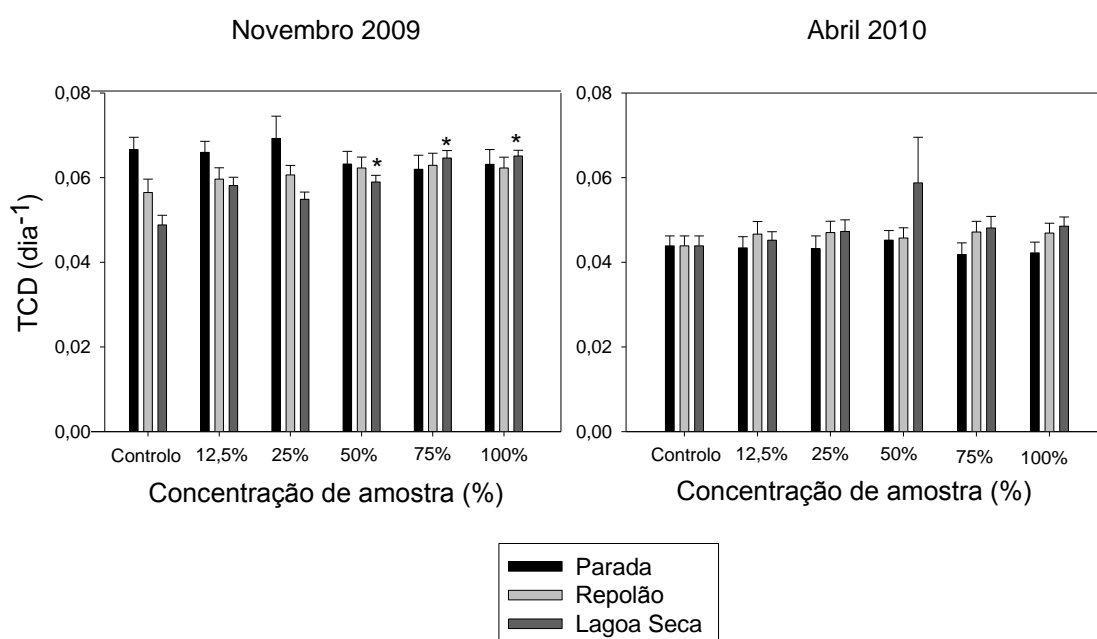


Figura 19 - Taxa de crescimento diário, TCD, (dia^{-1}) determinada para *D. magna* quando exposta às diferentes amostras de água recolhidas em Novembro de 2009 e em Abril de 2010. As barras de erro indicam o erro padrão e os asteriscos indicam diferenças significativas entre concentrações e o controlo ($p < 0.05$).

Tabela 17 - Resumo da análise de variância simples (ANOVA unifactorial) feita às diferenças na taxa de crescimento diário, TCD, de *D. magna* entre diferentes concentrações de amostra e controlo, valores de NOEC e LOEC e síntese dos valores de EC₅₀ em percentagem de amostra para 95% de confiança.

| | Local de amostragem | df | MS _{res} | F ratio | H | p | NOEC | LOEC | EC ₅₀ |
|---------------|---------------------|----|-------------------|---------|------|--------|------|------|------------------|
| Novembro 2009 | Parada | 5 | 6,44E-05 | 0,61 | - | 0,695 | - | - | >100 |
| | Ponte do Repolão | 5 | - | - | 4,02 | 0,547 | - | - | >100 |
| | Lagoa Seca | 5 | 3,47E-04 | 12,13 | - | <0,001 | 25% | 50% | >100 |
| Abril 2010 | Parada | 5 | 1,19E-05 | 0,21 | - | 0,958 | - | - | >100 |
| | Ponte do Repolão | 5 | 1,45E-05 | 0,24 | - | 0,943 | - | - | >100 |
| | Lagoa Seca | 5 | - | - | 3,73 | 0,590 | - | - | >100 |

Os efeitos na taxa r e os valores de EC₅₀ determinados estão apresentados na figura 20 e na tabela 18. Observaram-se diferenças significativas ($p < 0,05$) nos locais Ponte do Repolão e Lagoa Seca. O local Ponte do Repolão, na campanha de Novembro de 2009, apresentou um LOEC correspondente à concentração de amostra de 12,5%, contudo, na campanha de Abril de 2010 o NOEC já correspondeu à concentração de 12,5% e o LOEC à concentração de 25%. O local Lagoa Seca apresentou na 1ª campanha um NOEC correspondente à concentração de amostra de 12,5% e o LOEC à de 25%, e na 2ª campanha um LOEC correspondente à concentração de amostra de 12,5%. No entanto, à semelhança dos efeitos da TCD, estas diferenças foram devidas a uma estimulação na taxa r à medida que aumenta a concentração de amostra. Esse efeito observado pode estar relacionado com a presença de partículas nutritivas dissolvidas e algas nas amostras de água recolhidas. O local Parada não apresentou diferenças significativas em nenhuma concentração nem em nenhuma das campanhas. Em resumo, foi observado um estímulo em todos os locais testados nas duas campanhas, e por conseguinte, não foi observada toxicidade para o cladócero *D. magna*.

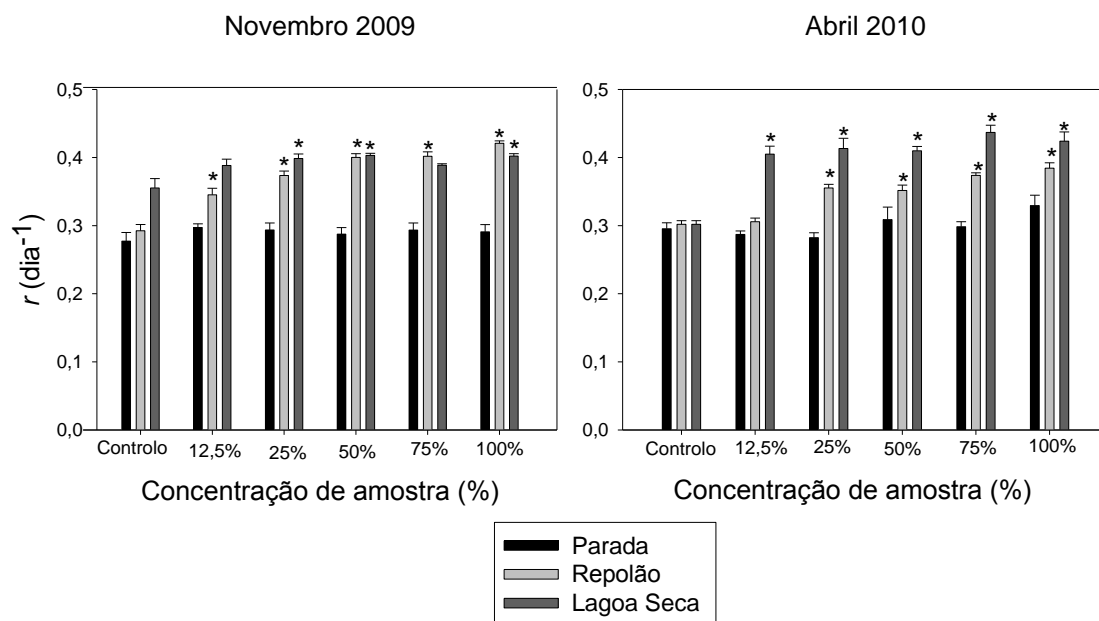


Figura 20 - Taxa de crescimento intrínseco, r (dia⁻¹), determinada para *D. magna* quando exposta às diferentes amostras de água recolhidas em Novembro de 2009 e em Abril de 2010. As barras de erro indicam o erro padrão e os asteriscos indicam diferenças significativas entre as concentrações de cada amostra e o controlo ($p < 0.05$).

Tabela 18 - Resumo da análise de variância simples (ANOVA unifactorial) feita às diferenças na taxa de crescimento intrínseco, r (dia⁻¹), de *D. magna* entre diferentes concentrações de amostra e controlo, valores de NOEC e LOEC e síntese dos valores de EC₅₀ em percentagem de amostra para 95% de confiança.

| | Local de amostragem | df | MS _{res} | F ratio | H | p | NOEC | LOEC | EC ₅₀ |
|---------------|---------------------|----|-------------------|---------|-------|--------|-------|-------|------------------|
| Novembro 2009 | Parada | 5 | - | - | 1,94 | 0,858 | - | - | >100 |
| | Ponte do Repolão | 5 | - | - | 41,91 | <0,001 | - | 12,5% | >100 |
| | Lagoa Seca | 5 | - | - | 18,08 | 0,003 | 12,5% | 25% | >100 |
| Abril 2010 | Parada | 5 | - | - | 8,70 | 0,122 | - | - | >100 |
| | Ponte do Repolão | 5 | 1,17E-02 | 27,17 | - | <0,001 | 12,5% | 25% | >100 |
| | Lagoa Seca | 5 | - | - | 27,98 | <0,001 | - | 12,5% | >100 |

Capítulo 5

Considerações finais

Capítulo 5 – Considerações finais

Este trabalho apresentou-se como a primeira avaliação ecotoxicológica efectuada na bacia do rio Cértima, sendo um contributo importante para a avaliação da qualidade de água nesta bacia.

Ao analisar amostras de água naturais temos de ter em consideração a grande complexidade de interacções físico-químicas e a grande diversidade de organismos que habitam os ecossistemas de água doce (Mooney *et al.*, 1996). Essa complexidade torna complicado definir a causa primordial para os efeitos observados. No entanto, os resultados obtidos permitiram elaborar uma série de considerações sobre a qualidade físico-química das águas superficiais da bacia do rio Cértima e sobre a ecotoxicidade da água nos pontos amostrados.

Em relação aos valores obtidos para os parâmetros físico-químicos, estes permitiram concluir que, à semelhança de estudos anteriores, o local mais impactado pela poluição orgânica foi a Lagoa Seca, com valores de percentagem de saturação de oxigénio dissolvido, carência bioquímica de oxigénio, fósforo total e azoto amoniacal registados em Novembro de 2009 acima dos valores máximos admissíveis definidos para a qualidade de águas superficiais de acordo com a legislação portuguesa Decreto-Lei 236/98, de 1 de Agosto. Em Abril de 2010 a qualidade físico-química da água nesse local melhorou sendo que apenas os valores de carência bioquímica de oxigénio e azoto amoniacal ultrapassaram os valores máximos admitidos pela legislação. O local Ponte do Repolão cumpriu todos os valores legislados, à excepção da percentagem de oxigénio dissolvido, na 1ª campanha. No entanto, apresentou um teor elevado em nutrientes, sendo por isso um local classificado como eutrófico, tal como o local Lagoa Seca. O local Parada, seleccionado como local de referência, foi o que apresentou melhor qualidade físico-química, obedecendo a todos os valores legislados e não revelando sinais de eutrofização, com excepção da 1ª campanha onde os valores de azoto foram típicos de locais eutrofizados. Em todos os locais amostrados verificou-se uma melhoria na qualidade de água entre a primeira e a segunda campanha, associada a um aumento dos caudais de água drenados pela bacia. Estes resultados permitiram concluir que grande parte das diferenças espaciais de qualidade de água são explicadas pela poluição orgânica resultante das diversas actividades antropogénicas desenvolvidas na bacia do rio Cértima, com destaque para a agricultura, a pecuária, a indústria e ainda para a densificação dos aglomerados populacionais. Estas actividades têm efeitos nos locais

Ponte do Repolão e Lagoa Seca. O local Parada, estando próximo da nascente apresenta uma pressão antrópica reduzida/nula.

Foi possível verificar que a sensibilidade relativa dos organismos teste às amostras de água foi idêntica em ambas as campanhas: *V. fischeri* > *P. subcapitata* > *L. minor* > *D. magna* (da mais sensível para a menos sensível). É importante referir que o facto de, por vezes, não ser detectada toxicidade pode não significar a inexistência de substâncias tóxicas na amostra na medida em que os altos teores de nutrientes detectados nos locais Ponte do Repolão e Lagoa Seca poderão mascarar a toxicidade de substâncias tóxicas (Lozano e Pratt, 1994). Por outro lado, o facto de ter havido redução da taxa de crescimento em algumas espécies expostas à amostra colhida no local Parada parece ser devida à carência em nutrientes e não à toxicidade de contaminantes. O local Repolão revelou toxicidade elevada em Novembro de 2009 para a bactéria *V. fischeri*. Esta toxicidade poderá ser devida à presença de substâncias com origem em descargas de águas residuais domésticas e industriais, assim como à poluição agrícola difusa a montante. No entanto, em Abril de 2010 já não foi detectada toxicidade, possivelmente devido ao aumento do caudal que terá diluído a presença de possíveis substâncias tóxicas. O mesmo local também revelou um ligeiro decréscimo da taxa de crescimento de *L. minor* na campanha de Abril, possivelmente devido à concentração de nutrientes ser mais baixa. O local Lagoa Seca apresentou efeitos negativos na taxa de crescimento de *P. subcapitata* a partir da concentração 75% (LOEC) na campanha de Novembro que se poderá dever ao alto teor de azoto amoniacal, que na sua forma não-ionizada (NH₃-N) pode provocar efeitos adversos em algumas espécies de algas (Källqvist e Svenson, 2003; Mucha *et al.*, 2003) e à grande concentração de sólidos que dificulta a passagem de luz, essencial para o crescimento da alga. O organismo *D. magna* apresentou estímulos tanto na amostra do local Repolão como na amostra do local Lagoa Seca. Isto pode ser devido à presença de partículas nutritivas dissolvidas e algas, abundantes em locais eutrofizados.

Os resultados ecotoxicológicos por si só não apontam para as mesmas conclusões de Silva (2008) que determinou a distribuição da comunidade de macroinvertebrados em vários pontos distribuídos na bacia do Rio Cértima, aplicando diversos índices biológicos de qualidade de água. A autora concluiu que o local Parada apresentava os melhores valores de índices, sendo classificado como água de boa qualidade. O local Ponte do Repolão foi classificado como água de qualidade fraca e finalmente o local Lagoa Seca como sendo o que apresentava pior qualidade sendo

classificado como água de muito fraca qualidade. A análise ecotoxicológica efectuada no presente estudo não corroborou a avaliação efectuada por Silva (2008) em ambos os locais impactados pela poluição orgânica, Lagoa Seca e Ponte do Repolão, o alto teor de nutrientes observado pode ter mascarado a toxicidade de contaminantes e favorecido o crescimento dos organismos, nomeadamente das plantas. Por oposição, os resultados obtidos por Silva (2008) são explicados pelos macroinvertebrados serem sensíveis a poluição orgânica.

Com este trabalho, foi possível identificar as limitações associadas aos dois tipos de análise efectuadas: físico-química e ecotoxicológica. A avaliação físico-química não permite determinar realmente qual o efeito que a água está a ter no ecossistema aquático. Já a avaliação ecotoxicológica *per si* não permite estabelecer causa-efeito. Deste modo, os ensaios ecotoxicológicos, em conjunto com a avaliação físico-química, proporcionam uma análise da real ecotoxicidade das substâncias presentes em determinadas espécies-teste. Contudo, dadas as limitações dos ensaios ecotoxicológicos em cenários de poluição orgânica, como consequência das elevadas concentrações de nutrientes, como é o caso da bacia do rio Cértima, a avaliação da qualidade da água deve envolver também a componente ecológica, com estudos ao nível da comunidade local (e.g. macroinvertebrados e perifiton). Deste modo, este trabalho permitiu concluir que é recomendável que os ecossistemas aquáticos sejam monitorizados através de uma análise integrada que envolve a componente físico-química, ecotoxicológica e ecológica, de forma a ultrapassar as limitações intrínsecas a cada tipo de avaliação.

Capítulo 6

Referências Bibliográficas

Capítulo 6 – Referências Bibliográficas

AE (1998). Microtox Manual. A. Environmental. Carlsbad CA, USA, Azur Environmental.

Allan, J. D. and M. M. Castillo (2007). Stream Ecology. Structure and Function of Running Waters, Springer.

Alonso, M. (1996). Crustacea – Branchiopoda. In: MAR Sánchez (coord. Ed.), Fauna Iberica, Vol. 7. Museo Nacional de Ciencias Naturales, CSIC, Madrid.

APHA (1995). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (19.^a ed.). Washington, DC: American Public Health Association, American Water works Association, Water Environment Federation.

ASTM – American Society for Test and Materials. (1980). Standard Practice for conducting acute toxicity tests with fishes, macroinvertebrates and amphibians. Reports E. 729-80. Philadelphia, American Standard for Testing and Materials.

Baird, D. J., Barber, I., Bradley, M., Calow, P. e Soares, A.M.V.M. (1989a). The *Daphnia* bioassay: a critique. Hydrobiologia.

Baird, D. J., Soares, A. M. V. M., Girling, A., Barber, I., Bradley, M., Calow, P. (1989b). The long-term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicity tests: problems and prospects. In: Lokke, H, Tyle, H, Bro-Rasmussen, F (eds) Proceedings First European Conference on Ecotoxicology, Lyngby

Barbour, M. T., Gerritsen, J., Snyder, B. D. e Stribing, J.B. (1999). Rapid Bioassessment Protocols for Use in Streams and Wadeable Rivers: Periphyton, Benthic Macroinvertebrates and Fish, Second Edition, Environmental Protection Agency: Office of Water: Washington (EPA 841-B-99-002).

Baudo, R. (1987). Ecotoxicological testing with *Daphnia*. Memorie dell' Istituto Italiano di Idrobiologia 45.

Benzie, J.A.H. (2005). Cladocera: The Genus *Daphnia* (including *Daphniopsis*). In: HJF Dumond (coord. Ed.), Guides to the identification of the microinvertebrates of the continental waters of the world, Vol. 21. Kenoby Productions, Ghent e Backhuys Publishers, Leiden.

Blaise, C. and Férard, J. F. Eds. (2005). Small-scale Freshwater Toxicity Investigations. Toxicity Test Methods, Springer.

CCDR-C - Comissão de Coordenação e Desenvolvimento Regional do centro. (2008). Obtido em 28 de Janeiro de 2008, de Caracterização/Indicadores, concelho: <http://www.ccdrc.pt/regiao/caracterizacao-indicadores/concelho>

Cerejeira, M. J., Pereira, T., Fernandes, A. M. S., Brito, F., Morbey, M. A., Mendonça, E., Picado, A., Silva, L., Cruz, M. E. e Caetano, L. (2005). "Projecto Agro24. Ensaios biológicos para avaliação da toxicidade das amostras de água." from <http://www.isa.utl.pt/dppf/agro24/>.

Cerqueira, M. A., Vieira, F. N., Ferreira, R. V. e Silva, J. F. (2005). The water quality of the Cértima river basin (Central Portugal). Environmental Monitoring and assessment, Springer. 111, 297-306.

CMA - Câmara Municipal de Águeda. (2007). *Plano Director Municipal de Águeda - Revisão. Resumo não técnico*. Águeda.

CMA - Câmara Municipal de Anadia. (1994). *Plano Director Municipal de Anadia. Estudos de Caracterização Física*. Anadia, CMA.

CMM - Câmara Municipal da Mealhada. (1994). *Plano Director Municipal da Mealhada*. Mealhada, CMM.

CMM - Câmara Municipal da Mealhada. (2008). Obtido em 19 de Fevereiro de 2008, de Actividades económicas: <http://www.cm-mealhada.pt>

CMO - Câmara Municipal de Oliveira do Bairro. (1994). *Plano Director Municipal de Oliveira do Bairro*. Oliveira do Bairro, CMO.

CMO – Câmara Municipal de Oliveira do Bairro. (2010). Obtido em 7 de Junho de 2010, de Actividades económicas: <http://www.cm-olb.pt>

Connell, D., Lam, P., Richardson, B. e Wu, R. (1999). Introduction to ecotoxicology, Blackwell Science.

Consórcio ACADvF - Consórcio AMBIO/ CHIRON/ AGRI.PRO/ DRENA/ vHLC/ FBO. (2002). *Plano de Bacia Hidrográfica do Rio Vouga, 1ª Fase - Análise e Diagnóstico de Referência. Volume I. Sumário Executivo*. Ministério do Ambiente e do Ordenamento do Território, Instituto da água, Direcção Regional do Ambiente do Centro.

Cooney, J. D. (1995). Freshwater tests. In: Rand, GM (ed) Aquatic toxicology: effects, environmental data, and risk assessment (2nd edition), London.

Cruz, I. F. V. C. (2007). Avaliação hidrogeológica e ecotoxicológica da água subterrânea do manancial de Paranhos, Porto. Departamento de Geociências. Aveiro, Universidade de Aveiro. Mestrado.

Decreto-Lei 236/98 de 1 de Agosto. Diário da República N.º 176/98 - I. Série A. Imprensa Nacional Casa da Moeda, Lisboa, Portugal.

Decreto-Lei N.º 384-B/99 de 23 de Setembro. Diário da República N.º 223/99 - I. Série-A. Imprensa Nacional Casa da Moeda, Lisboa, Portugal.

Deng, H. W. e Lynch, M. (1996). Change of genetic architecture in response to sex. Genetics 143.

Directiva 2000/60/CE de 23 de Outubro. Jornal Oficial das Comunidades Europeias L327. Parlamento Europeu e do Conselho, Portugal.

Dodds, W.K., Jones, J.R., Welch, E.B., 1998. Suggested classification of stream trophic state: distributions of temperate stream types by chlorophyll, total nitrogen, and phosphorus. Water Research 32,1455-1462.

EPA (2002). Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms. (4th edition), U.S. Environmental Protection Agency.

FAO (2010). "(Food and Agriculture Organization of the United Nations)." Aquastat – FAO's Information System on Water and Agriculture. Janeiro de 2010, from <http://www.fao.org>.

Fernandes, D. F. d. R. (2009). Avaliação e monitorização integrada do estado de qualidade da água do rio Antuã. Departamento de Ambiente e Ordenamento. Aveiro, Universidade de Aveiro. Mestrado.

Ferreira, R. S. e. V. (2007). Avaliação hidroquímica e da qualidade da água na bacia do rio Cértima (Portugal). Departamento de Ambiente e Ordenamento. Aveiro, Universidade de Aveiro. Mestrado.

Ferreira, R. V., Cerqueira, M. A., Melo, M. T. C., Figueiredo, D. R. e Keizer, J. J. (2010). Spatial patterns of surface water quality in the Cértima River basin, central Portugal. *Journal of Environmental Monitoring*, RSCPublishing. 12, 189-199.

G. Orioli, M. Sabbatini, J. Marchena and R. Vazquez, *Hydrological Sciences Journal*, 2008, 53, 834–843.

Gerhardt, A., Ed. (2000). Biomonitoring of Polluted Water. Environmental Research Forum Volume 9., Trans Tech Publications.

Gleick, P. H. (1993). Water in Crisis. A Guide to the World's Fresh Water Resources, New York : Oxford University Press.

Gomes, A. I. E. (2007). Avaliação da Ecotoxicidade de Águas Superficiais. Aplicação à Bacia Hidrográfica do Rio Leça. Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto. Mestrado.

Guilhermino, L. (1996). Modelos e sistemas de avaliação da toxicidade de substâncias químicas. Tese de Doutoramento. ICBAS.

Hauer, F. R. and G. A. Lamberti, Eds. (2007). *Methods in Stream Ecology*, Academic Press.

Hoffman, D. J., Rattner, B. A., Burton, G. A. Jr, Cairns, J. Jr, Eds. (1995). *Handbook of ecotoxicology*, Lewis Publishers.

Holt, J. G. Ed. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th edition. Williams e Wilkins.

INAG (2008). Manual para avaliação biológica da qualidade da água em sistemas fluviais segundo a Directiva Quadro da Água: Protocolo de amostragem e análise para os macroinvertebrados bentónicos, Instituto da Água, I. P., Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional. Janeiro, 2008.

INE - Instituto Nacional de Estatística. (2005). Obtido em 8 de Junho de 2007, de Estatísticas territoriais. Taxas de atendimento de infraestruturas: <http://www.ine.pt>

K. Kangur and T. Mols, *Hydrobiologia*, 2008, 599, 31–39.

Källqvist T., Svenson A., 2003. Assessment of ammonia toxicity in tests with the microalga, *Nephroselmis pyriformis*, Chlorophyta. *Water Res.* 37.

Klaassen, Curtis D.; Watkins III, John B. (2003). *Essentials of Toxicology*. The McGraw-Hill Companies Inc.

Koivisto, S. (1995). Is *Daphnia* an ecologically representative zooplankton species in toxicity tests? *Environmental Pollution* 90.

Lampert, W. (2006). *Daphnia*: model herbivore, predator and prey. *Polish Journal of Ecology* 54.

Landolt E, Kandeler R (1987) Biosystematic investigations in the family of duckweeds (4): the family of Lemnaceae – a monographic study (2), Veröffentlichung des Geobotanischen Instituts der ETH, Zürich, 95. Heft

Lozano, R. B. e Pratt, J. R. (1994). Interaction of toxicants and communities: the role of nutrients. *Environ. Toxicol. Chem.* 13.

M. Sondergaard and E. Jeppesen, *Journal of Applied Ecology*, 2007, 44, 1089–1094

Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V., Clark, D. P. Eds. (2008). *Brock Biology of Microorganisms*. 12th edition. Benjamin Cummings.

Manecas, I. S. (2006). *Caracterização Geoquímica da Bacia Hidrográfica do Rio Cértima*. Dissertação de Mestrado em Geoquímica, Universidade de Aveiro, Departamento de Geociências, Aveiro.

Mason, C. F. (2002). *Biology of freshwater pollution*. 4th edition. Longman London and New York.

Meyer J.S., Ingersoll C.G., McDonald L.L., Boyce M.S. (1986). Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs. Bootstrap techniques. *Ecology* 67, 1156-1166.

Miranda, L. M. (1983). *Localização e Caracterização de Efluentes Líquidos da Bacia do Cértima*. Relatório de disciplina de projecto, Universidade de Aveiro, Departamento de Ambiente.

Mooney, H. A., Cushman, J. H., Medina, E., Sala, O. E. e Schulze, E. D. (1996). *Functional Roles of Biodiversity: A Global Perspective*. John Wiley & Sons Ltd.

Mucha A. P., Leal M.F.C., Bordallo A.A., Vasconcelos M.T.S.D., 2003. Comparison of the response of three microalgae species exposed to elutriates of estuarine sediments based on growth and chemical speciation. *Environ. Toxicol. Chem.* 22.

Newman, M. C., Unger, M. A. (2002). *Fundamentals of ecotoxicology*. 2nd edition. Lewis Publishers, New York.

OECD (1998). OECD guidelines for the testing of chemicals, guideline 211: *Daphnia magna* Reproduction Test. adopted September 1998.

OECD (2004). OECD guide lines for testing of chemicals 202 – *Daphnia sp.*, Acute Immobilization test. Adopted April 2004.

OECD (2006). OECD guidelines for the testing of chemicals, guideline 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test. adopted March 2006.

OECD (2006). OECD guidelines for the testing of chemicals, guideline 221: *Lemna sp.* Inhibition Test. adopted March 2006.

P. J. A. Withers and H. P. Jarvie, Science of the Total Environment, 2008, 400, 379–395

Pereira, M. J., Almeida, S. A., Rino, J. M., Gil, M. C., e Pinho, R. M. (1998). Aspectos da Qualidade de Águas Superficiais da Região de Aveiro. IV Congresso da Água, APRH, FIL, Lisboa.

Pereira, J.L.L.E. (2008). Variações populacionais de cladóceros sujeitos a diferentes condições de *stress*. Dissertação de douturamento em Biologia. Aveiro, Universidade de Aveiro.

Pérez, J. R., Loureiro, S., Menezes, S., Palma, P., Fernandes, R. M., Barbosa, I. R., Soares, A. M. V. M. (2009). "Assessment of water quality in the Alqueva Reservoir (Portugal) using bioassays." Environ Sci Pollut Res.

PNA. Plano Nacional da Água. Aprovado pelo Decreto-Lei n.º112/2002, de 17 de Abril. Diário da República N.º90/2002 N.º90/2002 – I. Série A. Imprensa Nacional da Casa da Moeda, Lisboa, Portugal.

Radić, S., Stipaničev, D., Cvjetko, P., Mikelić, I. L., Rajčić, M. M., Širac, S., Pevalek-Kozlina, B. e Pavlica, M. (2009). "Ecotoxicological assessment of industrial effluent using duckweed (*Lemna minor* L.) as a test organism." Ecotoxicology 19:216–222.

Rand, G. M., Wells, P. G., McCarty, L. S. (1995). Introduction to Aquatic Toxicology. In: Rand, GM (ed) Aquatic toxicology: effects, environmental data, and risk assessment (2nd edition), London.

Reis, A. R. (2000). Condicionantes hidrogeológicas e antrópicas na mobilização de elementos poluentes. Um estudo nos rios Águeda e Cértima (Portugal Central). Dissertação de Mestrado em Geociências, Universidade de Coimbra, Departamento de Ciências da Terra, Coimbra.

Rino, J. M., e Gil, M. C. (1987). Diatomáceas do rio Cértima - estudo preliminar. Revista de Biologia. Universidade de Aveiro , 1, 53-103.

Sarma S.S.S. e Nandini, S. (2006). Review of recent ecotoxicological studies in cladocerans. Journal of Environmental Science and Health B 41.

Sena, C. (2007). Interações água subterrânea-água superficial na zona da Pateira de Fermentelos (Portugal). Dissertação de Mestrado em Geociências, Universidade de Aveiro, Departamento de Geociências, Aveiro.

Serrano, L. (1979). A carga em suspensão transportada pelo rio Cértima. Boletim do Museu e Laboratório Mineralógico e Geológico da Faculdade de Ciências , 16 (1), 285-295.

Silva, M. H. M. P. (2008). Avaliação e monitorização integrada do estado de qualidade da água da bacia hidrográfica do rio Cértima. Departamento de Ambiente e Ordenamento. Aveiro, Universidade de Aveiro. Mestrado.

Smith, V.H., Tilman, G.D., Nekola, J.C. (1999). Eutrophication: impacts of excess nutrient inputs on freshwater, marine, and terrestrial ecosystems.100. 179-196.

Teixeira, C. (1990). Rio Cértima. Estudo da qualidade da água e caracterização das cargas poluentes. Porto: Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto.

Vidotti, E. C., Rollemberg, M. C. (2004). Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. Química Nova, vol. 27.

Walker, C. H., Hopkin, S. P., Sibly, R. M. e Peakall, D. B. (2001). Principles of ecotoxicology, Taylor e Francis.

Zar JH (1996) Biostatistical analysis, 3rd edn. Prentice-Hall, Upper Saddle River, NJ.

ANEXOS

ANEXOS**ANEXO A: Valores máximos admissíveis (VMA) e valores máximos recomendados (VMR) para os parâmetros de qualidade da água constantes no Decreto-Lei nº 236/98, de 1 de Agosto.**

Tabela A1 - Valores máximos admissíveis (VMA) e valores máximos recomendados (VMR) para os parâmetros de qualidade da água constantes no Decreto-Lei nº 236/98, de 1 de Agosto.

| Anexo I | | | | | | | |
|--------------------------|--------------------------|------|--------|------|--------|------|--------|
| | | A1 | | A2 | | A3 | |
| Parâmetro | Expressão dos resultados | VMR | VMA | VMR | VMA | VMR | VMA |
| Sólidos suspensos totais | mg/L | 25 | - | - | - | - | - |
| Condutividade | µS/cm (20°C) | 1000 | - | 1000 | - | 1000 | - |
| Nitratos | mg/L NO ₃ | 25 | (O) 50 | - | (O) 50 | - | (O) 50 |

| Anexo XXI | | |
|---------------------|----------------------------------|---------|
| Parâmetro | Expressão dos resultados | VMA |
| pH | Escala de sorensen | 5.0-9.0 |
| Temperatura | °C | 30 |
| Oxigénio Dissolvido | % de saturação de O ₂ | 50 |
| CBO ₅ | O ₂ mg/L | 5 |
| Azoto Amoniacal | N mg/L | 1 |
| Fósforo total | P mg/L | 1 |

ANEXO B: Critérios para a avaliação do estado trófico de rios, segundo

Dodds *et al.* (1998):

Tabela B1 - Critérios para avaliação do estado trófico de rios, segundo Dodds *et al.* (1998).

| Estado trófico | N-Total (mg/m ³) | P-Total (mg/m ³) | Chl a suspensa | Chl a bentónica |
|----------------|---------------------------------|---------------------------------|----------------|-----------------|
| Oligotrófico | <700 | <25 | <10 | <20 |
| Mesotrófico | 700-1500 | 25-75 | 10-30 | 20-70 |
| Eutrófico | >1500 | >75 | >30 | >70 |